

Untersuchungen zur Lipoinitiation während der nichtribosomalen Synthese von Daptomycin und Surfactin

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Melanie Wittmann
aus Augsburg

Marburg/Lahn 2010

Vom Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation am 03.05.2010 angenommen.

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel
Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Lars-Oliver Essen

Tag der mündlichen Prüfung: 10.05.2010

für meinen Vater

Ein Teil dieser Arbeit wurde wissenschaftlich veröffentlicht und ist zu finden unter folgender Literaturstelle:

M. Wittmann, U. Linne, V. Pohlmann, M.A. Marahiel, *FEBS Journal* **2008**, Vol. 275, No. 21, pp. 5343-5354 „Role of DptE and DptF in the lipidation reaction of Daptomycin”

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Untersuchungen zur Lipoinitiation während der nichtribosomalen Synthese von Daptomycin und Surfactin“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

Zusammenfassung

Die zyklischen Lipopeptid-Antibiotika stellen eine Klasse strukturell verwandter und bioaktiver Oligopeptide dar, welche durch multimodular aufgebaute Enzymkomplexe, den nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) assembliert werden. Essenziell für die antibiotische Aktivität ist die mit dem Peptidrückgrat verbundene Lipid-Einheit, welche einen einzigartigen Wirkmechanismus dieser Verbindungen ermöglicht. Die Modifikation dieser Fettsäure-Komponente ermöglicht somit die Optimierung der pharmakologischen Eigenschaften der Lipopeptid-Antibiotika bezüglich der Bioaktivität, Stabilität sowie der Pharmakokinetik.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die mechanistische Aufklärung der Lipoinitiation des aziden Lipopeptids Daptomycin (Cubicin®) und des Biotensids Surfactin. Dazu sollten mittels bioinformatischer Methoden die für die Acylierung verantwortlichen Proteine identifiziert und *in vivo* und *in vitro* charakterisiert werden.

Die bioinformatische Genomanalyse des Daptomycin Produzentenstammes *Streptomyces roseosporus* ermöglichte die Identifizierung der im Daptomycin Biosynthesegencluster codierten Acyl-CoA-Synthetase DptE und des Acyl-Carrier-Proteins (ACP) DptF als putative Lipidierungsmaschinerie. Zur *in vitro* Charakterisierung wurden diese Enzyme heterolog produziert, isoliert und auf ihre Aktivität und Substratspezifität hin untersucht. Hierbei zeigte sich, dass DptE eine hohe Substrattoleranz aufweist und diverse Fettsäuren als Adenylat aktiviert und auf das kognate ACP DptF transferiert. Kinetische Spezifitätsuntersuchungen bestätigten, dass DptE eine hohe Präferenz für Fettsäuren zeigt, welche auch im natürlichen Daptomycin-Komplex (A21978C-Faktoren) vorkommen. Die Analyse der Transferreaktion mit verschiedenen ACPs zeigte, dass DptE eine hohe Affinität gegenüber DptF aufweist.

Im Gegensatz zu Daptomycin konnten im Biosynthesegencluster von Surfactin (*Bacillus subtilis* MR168) keine Acyl-CoA-Synthetasen identifiziert werden, welche β -Hydroxy-myristinsäure aktivieren und auf das Beladungsmodul (SrfA-M1) übertragen können. Die Analyse des annotierten *B. subtilis* Genoms zeigte vier putative Proteine (LcfA, YhfL, YhfT, Yngl) mit Sequenzhomologien zu Acyl-CoA-Synthetasen, welche nicht im Surfactin-Operon codiert vorlagen. Zur biochemischen Charakterisierung wurden diese heterolog produziert, isoliert und biochemisch untersucht. Hierbei zeigte sich, dass LcfA und YhfL die native β -Hydroxy-myristinsäure als CoA-Thioester aktivieren, wohingegen YhfT das Substrat ausschließlich als Adenylat aktiviert. Die Generierung von *lcfA*-, *yhfT*- und *yngl*-Deletionsmutanten in *B. subtilis* bestätigten die Beteiligung der identifizierten Enzyme an der Acylierung von Surfactin. So führte die gleichzeitige Deletion der drei putativen Acyl-CoA-Synthetasen zu einer Reduktion der Surfactin-Produktion um 98%. Zukünftige Komplementierungsstudien werden eine detailliertere Analyse der Lipidierungs- und Initiierungsreaktion während der Surfactin-Assemblierung ermöglichen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Lipidierung der klinisch relevanten zyklischen Lipopeptide Daptomycin und Surfactin resultieren in der Postulierung zweier unterschiedlicher Acylierungsstrategien während der nichtribosomalen Synthese von Oligopeptiden. Die Umsetzung der hierdurch gewonnenen Erkenntnisse sollte in Zukunft die Generierung von Daptomycin- und Surfactin-Derivaten mit optimierter Bioaktivität durch *metabolic engineering* ermöglichen.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	1
2	Einleitung	5
2.1	Gesundheitspolitische Aspekte der Antibiotika-Therapie	5
2.2	Antibiotika und ihre Ursprünge.....	5
2.3	Produkte der nichtribosomalen Peptidbiosynthese	6
2.4	Die nichtribosomale Peptidbiosynthese	8
2.4.1	Domänen nichtribosomaler Peptidsynthetasen	11
2.4.1.1	Die Adenylierungsdomäne.....	12
2.4.1.2	Die Thiolierungsdomäne	12
2.4.1.3	Die Kondensationsdomäne.....	13
2.4.1.4	Kondensationsdomänen der Initiationsmodule	13
2.4.1.5	Weitere optionale Domänen nichtribosomaler Peptidsynthetasen.....	14
2.4.1.6	Thioesterasedomäne	15
2.4.2	Strukturelle Einblicke in das Terminationsmodul SrfA-C	15
2.4.3	Abweichungen vom Grundschemata der modularen NRP- Biosynthese	16
2.5	Weitere Thiotemplat-abhängige Biosynthesen	17
2.5.1	Die Polyketidsynthese - grundlegende Prinzipien	17
2.5.2	Die Fettsäurebiosynthese.....	18
2.6	Phosphopantetheinyl-Transferasen	19
2.7	Fettsäurehaltige nichtribosomale Peptide	19
2.7.1	Acylierungsreaktionen von Mycosubtilin und CDA	21
2.7.2	Azide Lipopeptid-Antibiotika	22
2.7.2.1	Das azide Lipopeptid-Antibiotikum Daptomycin.....	23
2.7.2.2	Die Biosynthese von Daptomycin	23
2.7.2.3	Der Wirkungsmechanismus von Daptomycin	24
2.7.2.4	Die Lipoinitiation von Daptomycin.....	25
2.7.3	Das zyklische Lipoheptapeptid Surfactin	26
2.7.3.1	Die Biosynthese von Surfactin	27
2.7.3.	Die Lipoinitiation von Surfactin	28
2.8	Aufgabenstellung	29
3	Material.....	30
3.1	Geräte.....	30

3.2	Feinchemikalien und Lösungsmittel	32
3.3	Enzyme	34
3.4	Primer	34
3.5	Vektoren	37
3.5.1	pQE60-Vektor	37
3.5.2	pRep4-Vektor	38
3.5.3	pBluescriptII SK (+)-Vektor	38
3.5.4	pGEX-4T-1-Vektor	38
3.5.5	pDG-Vektoren	39
3.5.6	pBAD102/D-TOPO-Vektor	39
3.5.7	pQTEV-Vektor	40
3.6	Mikroorganismen	40
3.7	Kulturbedien	42
3.8	Antibiotika	42
3.9	Standardpuffer und Lösungen	43
4	Methoden	44
4.1	Molekularbiologische Methoden	44
4.1.1	Anzucht von <i>Streptomyces roseosporus</i>	44
4.1.2	Isolierung chromosomaler DNA	44
4.1.3	DNA-Techniken	45
4.1.4	Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation einfacher DNA- Abschnitte	45
4.1.5	Reinigung von PCR-Fragmenten	47
4.1.6	PCR zur Herstellung von Deletionsmutanten	47
4.1.7	Colony-PCR	49
4.1.8	Hydrolytische Spaltung von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen	50
4.1.9	Gelelektrophoretische Trennung von DNA durch Agarosegele	50
4.1.10	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	51
4.1.11	Ligation von DNA-Fragmenten	51
4.1.12	Konstruktion der Expressionsplasmide	51
4.1.12.1	Das Konstrukt pQE60- <i>acpK</i>	51
4.1.12.2	Konstruktion von pET28a(+)- <i>lipD</i>	52
4.1.12.3	Konstruktion von pBAD102/D-TOPO- <i>dptE</i>	52

4.1.12.4	Konstruktion von pQTev- <i>dptF</i>	53
4.1.12.5	Konstruktion von pQTev- <i>dptA-M1</i>	53
4.1.12.6	Konstruktion von pGex-4T-1- <i>dptA-M1</i>	53
4.1.12.7	Konstruktion von pQe60- <i>lcfA</i>	54
4.1.12.8	Konstruktion von pBAD102- <i>yhfL</i> und pBAD102- <i>yngl</i>	54
4.1.13	Herstellung elektrokompenter Bakterien	55
4.1.14	Transformation elektrokompenter Bakterien	55
4.1.15	Transformation von <i>B. subtilis</i>	56
4.1.16	Plasmidisolierung nach dem Mini-Maßstab	56
4.1.17	Plasmidisolierung nach dem Maxi-Maßstab	57
4.2	Proteinchemische Methoden	57
4.2.1	Expression von Fusionsproteinen in Bakterien	58
4.2.1.1	Expression unter der Kontrolle des <i>lac</i> -Promotors	58
4.2.1.2	Expression unter der Kontrolle des <i>ara</i> -Promotors	58
4.2.1.3	Expression mittels Autoinduktion	59
4.2.1.4	Genexpression von <i>lcfA</i> und <i>acpK</i> mit dem pQE60-Vektorsystem	59
4.2.1.5	Genexpression in ArcticExpress™-Zellen	60
4.2.2	Auftauen und Einfrieren von Bakterienzellen	60
4.2.3	Präparation von <i>E. coli</i> Rohzelleextrakten	60
4.2.4	Proteinreinigung durch Affinitätschromatografie	61
4.2.4.1	His-tag-Fusionsproteine	61
4.2.4.2	GST-tag-Fusionsproteine	62
4.2.5	Dialyse von Proteinlösungen mit Dialyseschlauch	62
4.2.6	Dialyse von Proteinlösungen mit HiTrap™-Desalting-Säulen	63
4.2.7	Ankonzentration von Protein-Lösungen	63
4.2.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	63
4.2.9	Coomassie Blau-Färbung von Polyacrylamidgelen	64
4.2.10	Bestimmung der Proteinkonzentration	65
4.3	Biochemische Methoden	65
4.3.1	ATP-PPi-Austauschreaktion	65
4.3.2	Fettsäure-Aktivierungsassy	66
4.3.3	Modifikation von ACPs und PCPs mit CoA oder CoA-Derivaten und Sfp... ..	67
4.3.4	Thioesterspaltung	67
4.3.5	Enzym-vermittelter Transfer von Fettsäuren auf <i>holo</i> -ACPs	68

4.3.6	Bestimmung der kinetischen Parameter der Lipidierung von DptF katalysiert durch DptE	68
4.4	Chemische Synthesen	69
4.4.1	Synthese von Fluoresceinyl-CoA	69
4.4.2	Synthese von Tryptophan-CoA	70
4.5	Analytische Methoden.....	71
4.5.1	Peptid-Massenfingerabdruck.....	71
4.5.2	Analyse mittels LC-MS	72
4.5.3	Analyse ACP-gebundener Substrate.....	72
4.5.4	Surfactin-Präparation	73
4.5.5	Nachweis von Surfactin mittels Hämolyse.....	74
4.5.6	Surfactin-Analyse mittels HPLC-MS	74
5	Ergebnisse I: Untersuchungen zur Acylierung von Daptomycin	75
5.1	Die putative Acyl-CoA-Synthetase DptE	75
5.2	Heterologe Expression und Isolation von DptE.....	76
5.3	Bestimmung der Adenylierungsreaktion der FACS DptE.....	77
5.3.1	Untersuchung der Adenylierungsreaktion in Abhängigkeit von CoA	77
5.3.2	Aktivitätsüberprüfung von DptE mit dem ACP DptF	78
5.3.3	Heterologe Expression und Isolation von DptF	78
5.3.4	Modifizierung von DptF mit Sfp	79
5.3.5	Koexpression des ACPs DptF mit Sfp und Aktivitätsstudien mit DptE	80
5.4	Nachweis der Fettsäure-Aktivierung als Adenylat.....	82
5.5	Kinetische Untersuchungen zur Bestimmung der Substratspezifität von DptE und DptF	83
5.5.1	Kinetische Untersuchung der Acylierung von DptF durch DptE	83
5.5.2	Kinetische Untersuchung der Fettsäure-Substratspezifität von DptE	83
5.6	Untersuchungen zur Übertragungsreaktion der Fettsäure-Komponente auf das Initiationsmodul	87
5.6.1	Heterologe Expression und Isolierung des Tryptophan-aktivierenden Moduls DptA-M1.....	87
5.5.2	Klonierung, heterologe Expression von <i>dptA-M1</i> in <i>E. coli</i> und Isolierung von DptA	88
5.6.3	Expression von DptA-M1 als GST-Fusionsprotein	89

6	Ergebnisse II: Untersuchungen zur Acylierung von Surfactin	92
6.1	Bioinformatische Identifizierung putativer Acyl-CoA-Synthetasen der Surfactin-Biosynthese	92
6.2	Heterologe Expression und Isolierung von LcfA	94
6.3	Heterologe Expression und Isolierung von YhfL und Yngl	95
6.4	Klonierung und Expression des Gens <i>yhfT</i>	96
6.5	Biochemische Charakterisierung von LcfA, YhfL und Yngl	96
6.5.1	ATP-PPi-Austauschreaktion	96
6.5.2	Entwicklung des Fettsäure-Aktivierungs-Assays	97
6.5.3	Aktivierung und Übertragung der β -Hydroxy-myristinsäure auf ein ACP	101
6.6	Konstruktion von Deletionsmutanten in <i>B. subtilis</i> OKB105	101
6.6.1	Konstruktion der <i>B. subtilis</i> Deletionsmutante $\Delta lcfA$	102
6.6.2	Konstruktion der <i>B. subtilis</i> Deletionsmutanten $\Delta yhfT$ und $\Delta yngl$	103
6.6.3	Konstruktion der <i>B. subtilis</i> Deletionsmutanten $\Delta yhfL$	104
6.6.4	Voruntersuchung auf Surfactin-Produktion mittels Hämolyse	104
6.7	Konstruktion von Mehrfachmutanten	105
6.7.1	Voruntersuchungen zur Surfactin-Produktion mittels Hämolyse	106
6.7.2	HPLC-MS-analytische Untersuchung	107
7	Diskussion und Ausblick	110
7.1	Die Initiationsreaktion von Daptomycin	111
7.1.2	Charakterisierung der Acyl-CoA-Synthetase DptE <i>in vitro</i>	112
7.1.3	Die Acyl-CoA-Synthetasen: Unspezifität führt zur Produktvielfalt	114
7.1.4	Die ACP-Spezifität von DptE	115
7.1.5	ATP-PPi-Austauschreaktion zur Aktivitäts- und Substratspezifitätsbestimmung von FACS und FAAL	116
7.1.6	Funktion der C-Domäne – Beteiligung an der Initiation	117
7.2	Die Lipoinitiationsreaktion von Surfactin	120
7.2.1	Model der Lipoinitiationsreaktion von Surfactin	120
7.2.2	Die Suche nach beteiligten Enzymen der Lipidierungsreaktion	121
7.2.3	Charakterisierung der FACS-Enzyme aus <i>B. subtilis</i>	122
7.2.3.1	Aktivitätsuntersuchungen der putativen FACS Yngl	123
7.2.3.2	Aktivitätsuntersuchungen der putativen FACS YhfT	124
7.2.4	ATP-PPi-Austauschreaktion zur ATP-Abhängigkeitsbestimmung	126
7.2.5	Substrattoleranz der Acyl-CoA-Synthetasen LcfA und YhfL	126

7.2.6	Surfactin-Hämolysseaktivität der FACS-Mutanten	127
7.3	Initiationsreaktionen von NRPS-Systemen allgemein	129
7.4	Schlussfolgerungen	130
8	Anhang	131
9	Literaturverzeichnis	137

1 Abkürzungen

aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
ACP	Acyl-Carrier-Protein
A-Domäne	Adenylierungsdomäne
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AK	Arbeitskreis
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
Amp	Ampicillin
AT	Acyltransferase
ATCC	Stammsammlung (englisch: <i>american type culture collection</i>)
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
<i>bla</i>	Ampicillin-Resistenz vermittelndes Gen (β -Lactamase-Gen)
Boc	Tert-Butyl-Oxycarbonyl
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CDA	Kalzium-abhängiges Antibiotikum
C-Domäne	Kondensationsdomäne
Ci	Curie
CoA	Coenzym A (auch als CoA-SH bezeichnet)
cpm	counts per minute
Cy-Domäne	Zyklisierungsdomäne
Da	Dalton (g/mol)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dH ₂ O	einfach destilliertes Wasser
DHB	,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotide
DTT	Dithiothreitol
E-Domäne	Epimerisierungsdomäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eq	Äquivalent
ESI	Elektronenspray-Ionisation
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FAAL	Fettsäure-AMP-Ligase (englisch: <i>fatty acid AMP-ligase</i>)
FACS	Fettsäure-CoA-Synthetase (englisch: <i>fatty acid-CoA-ligase</i>)
FAS	Fettsäuresynthase
F-Domäne	Formylierungsdomäne

FPLC	schnelle Flüssigkeitschromatografie (englisch: <i><u>fast protein liquid chromatography</u></i>)
FT-ICR/MS	Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometer
hArg	β-Hydroxy-Arginin
hAsn	β-Hydroxy-Asparagin
HEPES	2-N'-[N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatografie (englisch: <i><u>high performance liquid chromatography</u></i>)
IMAC	immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatografie
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalacto-Pyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Kan	Kanamycin
<i>kan</i>	Kanamycin Resistenzkassette
L	Liter
M	molar (mol/L)
μ	mikro (10 ⁻⁶)
MALDI-MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-Ionisations Massen-Spektrometrie
MCS	multipler Klonierungsbereich (englisch: <i><u>multiple cloning side</u></i>)
M-Domäne	N-Methylierungsdomäne
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min	Minute
mL	Milliliter
<i>mls</i>	Macrolid, Lincosamid, Streptogramin Resistenzkassette
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
μL	Mikroliter
n	nano (10 ⁻⁹)
n.d.	nicht determiniert
NCBI	National Center of Biological Information
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
NRP	Nichtribosomales Peptid
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthetase
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (englisch: <i><u>open reading frame</u></i>)
<i>ori</i>	Replikationsursprung (englisch: <i><u>origin of replication</u></i>)
Ox-Domäne	Oxidationsdomäne
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCP	Peptidyl-Carrier-Protein
PCR	Polymerasekettenreaktion (englisch: <i><u>polymerase chain reaction</u></i>)
PK	Polyketid
PKS	Polyketidsynthase
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid

4'-Ppan	4'-Phosphopantethein
PPi	anorganisches Pyrophosphat
PPTase	4'-Phosphopantetheinyl-Transferase
PyBOB	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-Pyrrolidino-Phosphonium-Hexafluorophosphat
RBS	Ribosomale Bindungsstelle
R-Domäne	Reduktasedomäne
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SIM	englisch: <i>single-ion mode</i>
<i>srf</i>	Surfactin
Sp	Spectinomycin
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
T-Domäne	Thiolierungsdomäne oder PCP-Domäne
Te-Domäne	Terminationsdomäne
TE II	Typ II Thioesterase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
<i>tet</i>	Tetracyclin-Resistenzkassette
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TOF	Flugzeit (englisch: <i>time of flight</i>)
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Tyc	Tyrocidin
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v	Volumen
v/v	Volumen/Volumen
w	Gewicht (englisch: <i>weight</i>)
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen
Z-Domäne	Heterozyklisierungsdomäne

Tab. 1-1. Aminosäuren: Abkürzungen und Molmassen

Aminosäure	Buchstabencode		M [g/mol]
	dreifach	einfach	
Alanin	Ala	A	89
Arginin	Arg	R	174
Asparagin	Asn	N	132
Aspartat	Asp	D	133
Cystein	Cys	C	121
Glutamat	Glu	E	
Glutamin	Gln	Q	146
Glycin	Gly	G	75
Histidin	His	H	155
Isoleucin	Ile	I	131
Kynurenin	Kyn		
Leucin	Leu	L	131
Lysin	Lys	K	146
Methionin	Met	M	149
3-Methylglutaminsäure	3mGlu		
Ornithin	Orn	O	132
Phenylalanin	Phe	F	165
Prolin	Pro	P	115
Serin	Ser	S	105
Threonin	Thr	T	119
Tryptophan	Trp	W	204
Tyrosin	Tyr	Y	181
Valin	Val	V	117

2 Einleitung

2.1 Gesundheitspolitische Aspekte der Antibiotika-Therapie

Die Entdeckung des antibiotischen Wirkstoffs Penicillin 1929 durch Flemming zählte zu einem der größten Meilensteine in der medizinischen Geschichte.^[1] Seit ihrer Entdeckung sind Antibiotika zu verlässlichen Werkzeugen bei der Bekämpfung gefährlicher Infektionskrankheiten geworden. Das Blatt hat sich jedoch in den letzten Jahrzehnten gewendet, und Infektionskrankheiten könnten aufgrund unzureichender Therapiemöglichkeiten zum Risiko werden. Neben dem Auftreten neuer pathogener Erreger ist die zunehmende Entwicklung von Resistenzen ein ernst zu nehmendes Problem.^[2] Vor diesem Hintergrund ist eine kontinuierliche Weiterentwicklung neuer Wirkstoffe zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten und zur Überwindung von Resistenzen wichtig. Dabei kommt sowohl der Auffindung neuer Wirkstoffe, als auch die gezielte strukturelle Veränderung bekannter Metabolite eine außerordentliche Bedeutung zu.^{[3][4][5]} Motive dieser Arbeit waren daher Wissenslücken zur Biosynthese von Antibiotika zu schließen und damit das Verständnis neuartiger antimikrobieller Systeme auszubauen.

2.2 Antibiotika und ihre Ursprünge

Mikroorganismen und Pflanzen produzieren eine Vielzahl an strukturell stark unterschiedlichen Sekundärmetaboliten, z. B. Pigmente, Geruchsstoffe, Alkaloide und Antibiotika. Viele der produzierten Sekundärmetabolite besitzen interessante Bioaktivitäten, die medizinisch wertvoll sind.^[6] Die biologische Rolle dieser Naturstoffe und ihre Bedeutung für die Mikroorganismen und Pflanzen sind zum Teil heute noch nicht abschließend verstanden.^[7-10] In den letzten Jahren hat sich eine Auffassung manifestiert, dass diese Stoffe als Träger der Kommunikation der Mikroorganismen untereinander zu verstehen sind.^{[11][12]}

Von den bisher mehr als 7000 bekannten bioaktiven Substanzen mikrobiellen Ursprungs wurden 30 % aus Pilzen und sporogenen Bacilli gewonnen. 70 % stammen allein aus den Actinobakterien, in der Streptomyceten die größte Antibiotika-produzierende Gattung darstellt.^{[13][14]}

Peptide und Lipopeptide, Produkte des Sekundärstoffwechsels, treten in der Natur häufig als Strukturisomere auf, die in der Aminosäurezusammensetzung und/oder in ihrer Lipidkomponente variieren können und damit die Mannigfaltigkeit dieser Naturstoffe erhöhen. Aus dieser Strukturvielfalt ergeben sich zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten. Industriell werden diese Verbindungen vor allem als Antibiotika, Immunmodulatoren und Biotenside genutzt.^[15] Zusätzlich bilden diese Bioprodukte aus biotechnologischer wie auch aus pharmakologischer Sicht interessante Ausgangsstrukturen zur Herstellung von semi- und totalsynthetischen Pharmaka.

Die Metabolisierung von Peptiden allgemein kann auf zwei unterschiedlichen Biosynthesewegen erfolgen: erstens, durch die ribosomale Synthese, wie z. B. beim Lantibiotikum Subtilin.^[16] Hierbei werden die Polypeptide mittels Ribosom und mRNA synthetisiert und anschließend posttranslational modifiziert. Zweitens, durch nichtribosomale Peptidbiosynthese.^{[17][18][19]} Auf den letzteren Weg soll im Folgenden, wegen der Präsenz in der vorliegenden Arbeit, näher eingegangen werden.

2.3 Produkte der nichtribosomalen Peptidbiosynthese

In den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts erkannte man am Beispiel von Gramacidin S, dass bestimmte kleine Peptidverbindungen nicht vom Ribosom synthetisiert werden.^[20] Mit dieser Entdeckung war die Welt der nichtribosomalen Peptidbiosynthese geschaffen. Heutzutage sind weit über 400 nichtribosomal produzierte Peptide bekannt und die Tendenz der Neuentdeckungen nimmt stetig zu.^[21]

Zu den wichtigsten Produzenten nichtribosomaler synthetisierter Peptide gehören Gram-positive Bodenbakterien der Gattungen Bacilli und Streptomyces, einige Gram-negative Bakterien wie Pseudomonas und Myxobakterien sowie filamentöse Pilze.^{[22][23]}

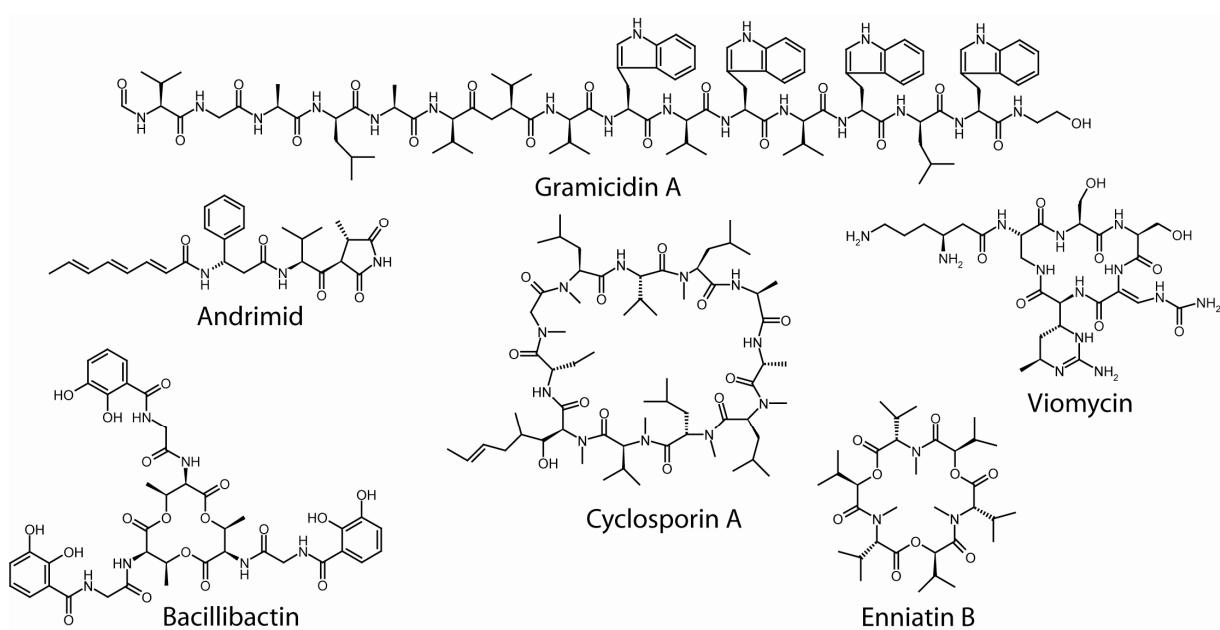


Abb. 2-1. Beispiele nichtribosomaler Peptide

Gramicidin A aus *Bacillus brevis*; Andrimid aus *Pantoea agglomerans*; Viomycin aus *Streptomyces puniceus*; Cyclosporin A aus *Tolypocladium niveum*; Bacillibactin aus *Bacillus subtilis*; Enniatin B aus *Fusarium* sp.

Ein besonderes Merkmal dieser Verbindungen ist ihre enorm hohe chemische Strukturvielfalt. Strukturen mit bis zu 48 Aminosäurebausteinen wurden bereits identifiziert (s. Abb. 2-1).^[24] Die enorme Diversität dieser Verbindungen reicht von einfachen linearen, zyklischen bis hin zu verzweigtkettigen zyklischen Verbindungen. Zusätzlich können zu den 20 proteinogenen Aminosäuren auch seltene Aminosäuren und andere Bestandteile, wie z. B. Ornithin, Citrullin, γ -Aminosäuren, D-konfigurierte α -Aminosäuren, N-methylierte Aminosäuren, Carbon-, Hydroxysäuren und Chromophore vorkommen.^{[20][25][26]} Weitere Modifikationen dieser Peptide zeigen sich in Form von Glykosylierung, Acylierung, Hydroxylierung sowie N-Methylierung und N-Formylierung der Haupt- und Seitenketten. Auch Strukturmerkmale wie Thiazolin- und Oxazolinringe in verschiedenen Oxidationsstufen sind keine Seltenheit.^[21]

2.4 Die nichtribosomale Peptidbiosynthese

Die Biosynthese der nichtribosomal synthetisierten Verbindungen wird durch große multifunktionelle Enzymkomplexe, den nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), katalysiert. Die Aufklärung der Struktur von NRPS erfolgte im Wesentlichen durch Sequenzierung ihrer Gene und Homologievergleiche. Ein moderneres Verfahren ist das *genome mining*.^[27-30] Mit dieser Methode werden bereits vollständig sequenzierte Genome mit Hilfe von bioinformatischen Verfahren nach potenziellen NRPS-Genclustern hin untersucht. NRPS sind modular aufgebaut, dabei werden aus Aminosäure-Bausteinen schrittweise lange Peptide assembliert. Durch die Eigenschaften der NRPS-Maschinerie kann eine höhere Strukturvielfalt erreicht werden, als dies bei der nukleinsäureabhängigen ribosomalen Synthese möglich ist.

Ein Modul ist als eine Einheit definiert, die alle katalytischen Aktivitäten enthält, die für den spezifischen Einbau einer Aminosäure in das Produkt notwendig sind. Jedes Modul erkennt, aktiviert und bindet sein spezifisches Substrat und verknüpft es mit dem Substrat des folgenden Moduls.^{[10][18][25][31][32]} Dabei werden die NRPS-Produkte in Analogie zur Fettsäurebiosynthese durch einen uniformen Mechanismus, dem Thiotemplat-Mechanismus, gebildet.^[33] Bei diesem sogenannten Multiple Carrier Modell interagieren die 4'-Ppan-Kofaktoren, die in jedem Modul vorkommen, miteinander. Dadurch erfolgt die Verknüpfung der einzelnen Substrate zu einer Peptidkette in einer Serie von Transpeptidierungsreaktionen, woraus sich, bildlich gesprochen, ein Fließband-Ablauf ergibt.^{[34][35]} Diese modular gebauten Biosysteme können als molekulare Maschinen aufgefasst werden, die von Natur aus erfunden wurden, um ein Maximum an chemischer Strukturdiversität auf "Gen-sparende" Weise generieren zu können.

Die Initiation der nichtribosomalen Peptidsynthese beginnt am ersten Modul, dem Initiationsmodul. Eine gerichtete Elongation bis zum letzten Modul des Systems führt zu einem schrittweisen Wachstum der Peptidkette vom N- zum C-Terminus. Durch Hydrolyse oder Zyklisierung des enzymgebundenen Intermediats am letzten Modul (Terminationsmodul) wird die Termination bewirkt, die das Produkt freisetzt.

Diese Aminosäure-aktivierenden Module werden weiter in Domänen eingeteilt, welche die eigentlichen katalytischen Einheiten der NRPS in sich vereinen. Je nach

Position und Funktion kann ein Modul entsprechend unterschiedliche Domänen enthalten.^[36] Die einfachste Zusammensetzung, die Minimalsausstattung eines NRPS-Moduls besteht aus drei Domänen, der Adenylierungsdomäne (A-Domäne), Kondensationsdomäne (C-Domäne) und Thiolierungsdomäne (T-Domäne oder auch PCP-Domäne). Dieses "Minimalmodul" ist essenziell für die erfolgreiche Aktivierung, Kondensation und Transport der Monomere über die Synthetasen. Dieses sogenannte Elongationsmodul kann um weitere Domänen ergänzt werden. Das Initiationsmodul eines NRPS-Komplexes enthält in der Regel keine C-Domäne. Das Terminationsmodul besitzt eine Thioesterasedomäne (Te-Domäne), die die katalytische Spaltung des Acyl-Thioesters vom Templat bewirkt (s. Abb. 2-2).^{[37][38]}

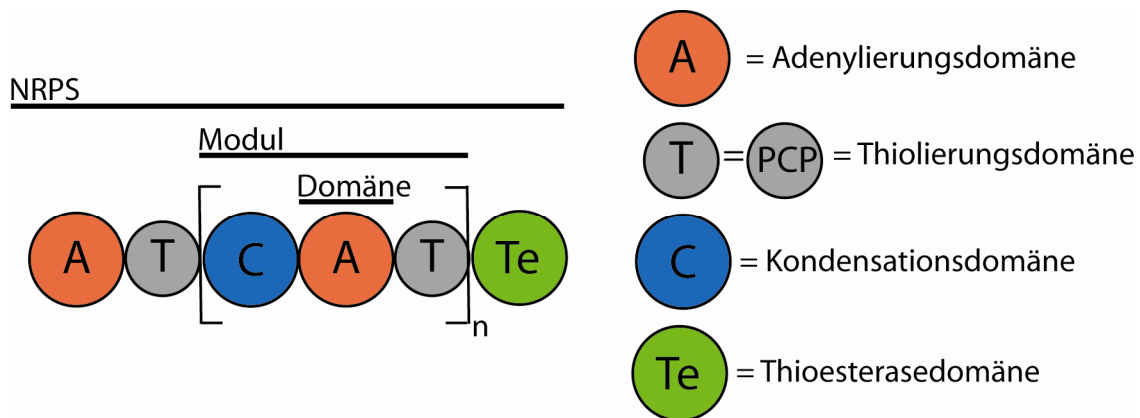


Abb. 2-2. Allgemeine Struktur nichtribosomaler Peptidsynthetasen

NRPS werden weiter in Module und Domänen aufgeteilt. Das Initiationsmodul enthält keine Kondensationsdomäne. Das Elongationsmodul enthält eine Kondensations-, eine Adenylierungs- und eine Thiolierungsdomäne. Das Terminationsmodul ist für die Freisetzung des Produktes verantwortlich und enthält eine Thioesterasedomäne. Optional können weitere Domänen in die jeweiligen Module integriert sein. Jedes NRPS-Biosynthesecluster enthält eine unterschiedliche Anzahl von Domänen, Modulen und Synthetasen.

Aus der Anzahl, Abfolge und der Domänen-Zusammensetzung der Module innerhalb eines NRPS-Systems ergibt sich die Primärstruktur des Polypeptid-Rückgrats. Dieser Zusammenhang wird als Colinearitätsregel bezeichnet.^[39]

Am Beispiel von Tyrocidin, ein zyklisches Dekapeptid aus *B. brevis*, soll im Folgenden die beschriebenen Gegebenheiten dargestellt werden (s. Abb. 2-3). Der Tyrocidin NRPS-Komplex besteht aus insgesamt 10 Modulen, verteilt auf drei separaten Proteinen. Alle Elongationsmodule enthalten die C-A-T-Architektur mit Ausnahme des Moduls M4, welches um eine Epimerisierungsdomäne ergänzt wurde. Das Initiationsmodul enthält keine C-Domäne, jedoch wurde es ebenfalls um eine E-

Domäne ergänzt. E-Domänen katalysieren die Epimerisierung von L-Aminosäuren in das D-Enantiomer. Das Terminationsmodul (M10) enthält eine Te-Domäne und katalysiert die intramolekulare Zyklisierung und Abspaltung des Produktes vom Protein-Templat. Insgesamt katalysiert der 10-modulare Tyrocidin-NRPS-Komplex den Einbau von 10 Aminosäurebausteinen in das Produkt und bestätigt damit das Colinearitätsprinzip.

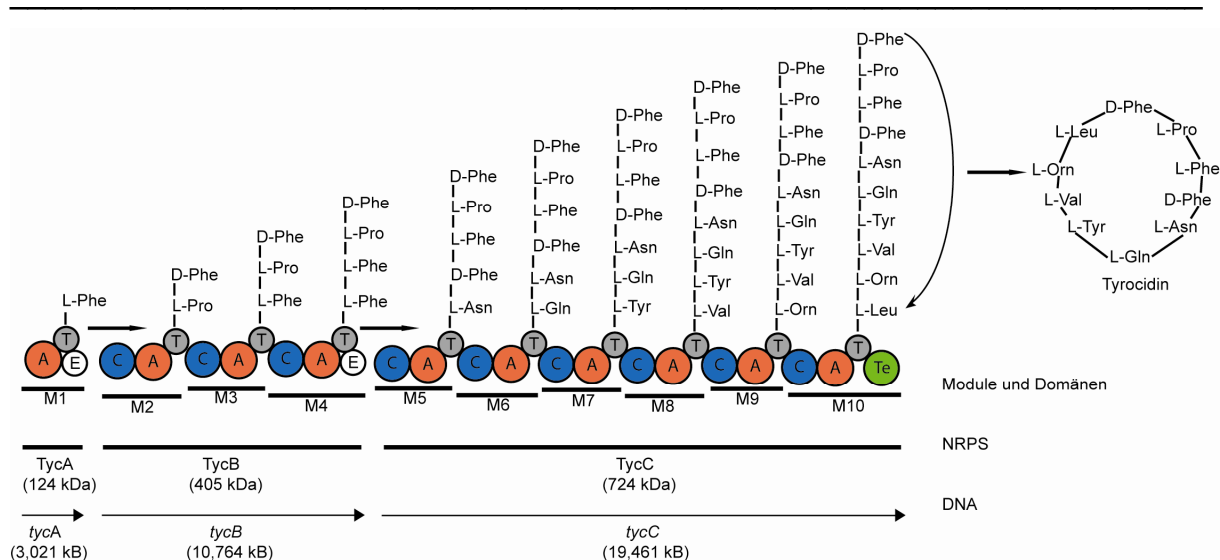


Abb. 2-3. Die Biosynthese des Peptidantibiotikums Tyrocidin aus *Bacillus brevis*

Die in einem Gencluster organisierten Gene *tycA* (3,021 kb), *tycB* (10,764 kb) und *tycC* (19,461 kb) codieren für drei NRPSs, die das Biosynthesetemplat für das Dekapeptid Tyrocidin bilden. Die NRPSs bestehen jeweils aus einem Modul, drei und sechs Modulen, die wiederum für den Einbau der 10 Aminosäuren in das Produkt verantwortlich sind. Module M1 und M4 enthalten je eine E-Domäne, die die Epimerisierung von L-Phe in die D-Spezies katalysieren. Die Te-Domäne im letzten Modul katalysiert die Freisetzung des Produktes.

Aus dem verhältnismäßig einfachen und modularen Aufbau der NRPSs werden neue Möglichkeiten bei der Entwicklung innovativer Wirkstoffe eröffnet. Insbesondere für komplexe Verbindungen, deren chemische Synthese schwer oder gar nicht möglich ist. Ein Beispiel hierfür ist die stereospezifische C-β-Hydroxylierung von L-Arginin. Diese Modifikation wird durch VioC aus *Streptomyces vinaceus* bei der Biosynthese von Viomycin (s. Abb. 2-1) katalysiert.^[40] Für das Design neuer Peptidantibiotika sind umfassende Kenntnisse über die Struktur und Funktionen der katalytischen Domänen sowie deren Zusammenspiel untereinander unerlässlich.

2.4.1 Domänen nichtribosomaler Peptidsynthetasen

Die Assemblierung von nichtribosomalen Peptiden durch NRPSs wird hauptsächlich durch drei Kern-Domänen koordiniert und katalysiert, die im Folgenden genauer beschrieben werden.^[18]

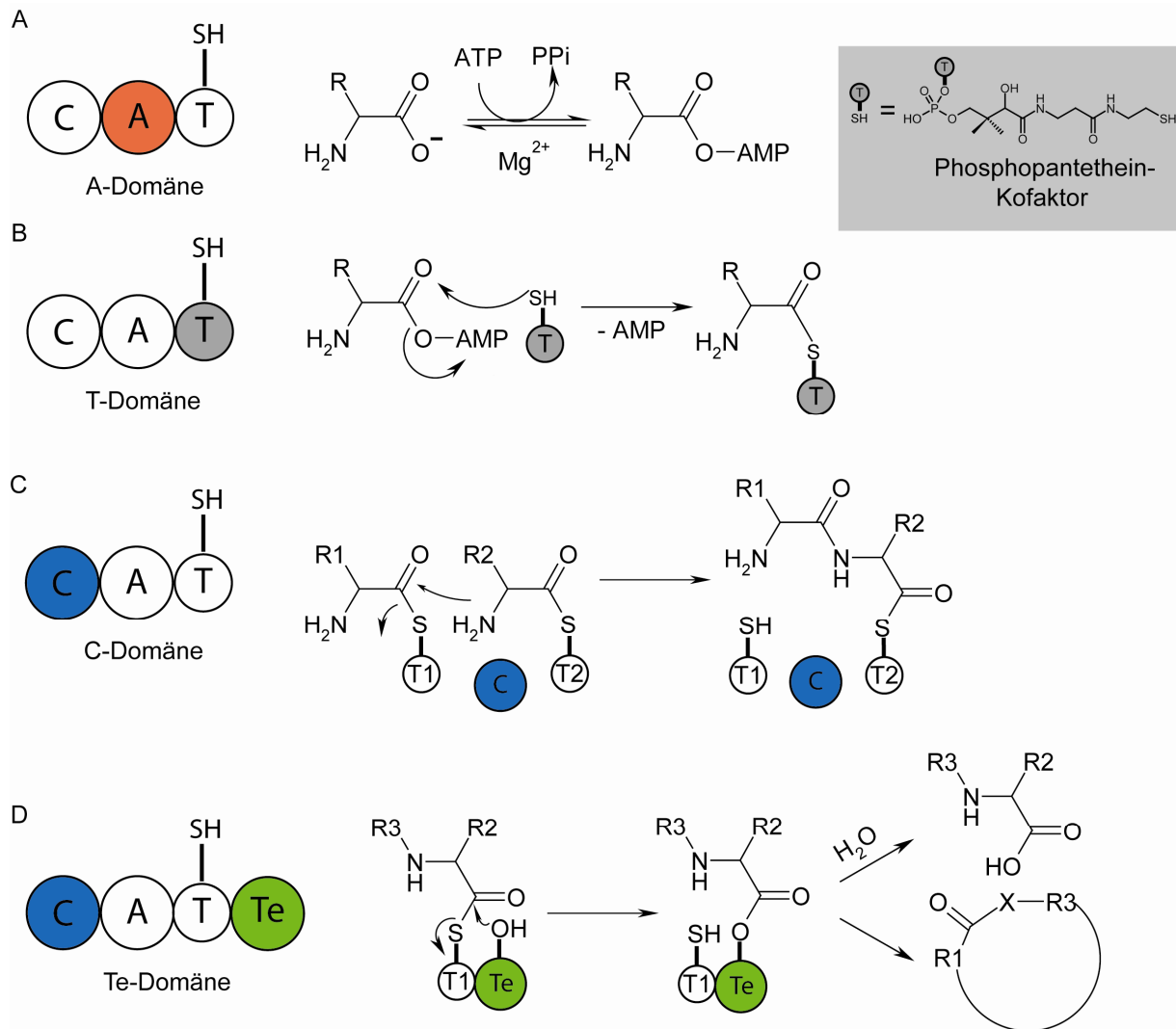


Abb. 2-4. Reaktionsschema der essenziellen NRPS-Domänen

A. Die A-Domäne (rot) katalysiert die Aktivierung ihrer kognaten Aminosäure zur Adenylat-Spezies in einer Mg²⁺-abhängigen Reaktion. B: Thiolierungsdomäne (grau): Nachdem die A-Domäne die Aminosäure als Adenylat aktiviert hat, wird diese auf die T-Domäne transferiert. Es kommt zur Ausbildung eines Aminosäureacyl-Thioesters, der weiter transportiert wird. C: Die Kondensationsdomäne (blau) katalysiert die Ausbildung einer Peptidbindung zwischen einer Aminosäure und der wachsenden Peptidkette. D: Die Te-Domäne (grün) katalysiert zuerst die kovalente Bindung der Peptidkette als Thioester und anschließend erfolgt die Freisetzung des Produkts durch Hydrolyse oder durch intramolekulare Zyklisierung der Peptidkette. X repräsentiert entweder einen Sauerstoff (Laktonring) oder einen Stickstoff (Laktamring). Der Phosphopantethein-Kofaktor (grauer Kasten) wird durch -SH abgekürzt.

2.4.1.1 Die Adenylierungsdomäne

Die A-Domäne gehört zur Klasse der Carbonyl-Adenylat-Ligasen^[41], zu der auch die Luziferasen^[42], die 4-Coumarat-CoA Ligasen^[43] und Acyl-CoA-Synthetasen^[44] gehören.^[45] Der Eintritt der Substrate in die NRPS-Maschinerie wird von der A-Domäne kontrolliert und hat daher eine besondere Bedeutung.^{[46][47]} Der Einbau des Substrates erfolgt durch einen zweistufigen Prozess. Zuerst wird reversible unter ATP-Hydrolyse Aminoacyl-Adenylat gebildet. Anschließend wird die Adenylat-Spezie auf eine reaktive Thiolgruppe am Enzym (Thiotemplat) übertragen (s. Abb. 2-4 A). Die A-Domäne umfasst ca. 550 Aminosäuren und besitzt zehn hoch konservierte Kern-Motive. Aus der Kristallstrukturanalyse von PheA, das Phenylalanin-aktivierende erste Modul der Gramacidin S-Synthetase, konnten Regeln zur Vorhersage der Substratspezifität abgeleitet werden.^{[45][48][49][50]} Bei A-Domänen findet man bezüglich ihrer Substratspezifität eine gewisse Flexibilität. Das ermöglicht wiederum den Einbau von unterschiedlichen Substraten in ein NRPS-Produkt. Daher kommen häufig in der Natur nichtribosomal assemblierte Strukturvarianten vor, die von dem gleichen NRPS-System produziert wurden.^[51]

2.4.1.2 Die Thiolierungsdomäne

Die Thiolierungsdomäne (T-Domäne oder auch Peptidyl-Carrier-Protein-Domäne kurz: PCP-Domäne) ist mit ca. 80-100 Aminosäurereste eine der kleinsten katalytischen Einheiten. Es stellt das gemeinsame Element in der Biosynthesestrategie der Peptidsynthetasen, der Polyketidsynthetasen und Fettsäuresynthetasen dar und ist das zentrale Transportprotein in der NRPS-Maschinerie.^[52] Ein hoch konservierter Serinrest bildet die Bindungsstelle für den wichtigen 4'-Phosphopantetheinyl-Kofaktor (4'-Ppan-Kofaktor).^{[52][54][53]} der durch eine Phosphopantetheinyl-Transferase (4'-Ppan-Transferase) übertragen wird (s. Abb. 2-4 B).^[55] Die T-Domäne muss nicht nur mit der A-Domäne interagieren, sondern auch mit anderen katalytischen Einheiten der NRPS. Daher wird auch die 20 Å große T-Domäne als „schwingender Arm“ bezeichnet, der die Peptid-Intermediate zu den einzelnen Domänen transportiert.^[56]

2.4.1.3 Die Kondensationsdomäne

Die C-Domäne ist verantwortlich für die katalytische Ausbildung der Peptidbindung (s. Abb. 2.4 C).^{[57][58]} Die Größenordnung dieser enzymatischen NRPS-Einheit liegt bei ca. 450 Aminosäureresten. Sieben konservierte Motive, welche im Vergleich zu den A-Domänen weniger stark konserviert sind, sind Merkmale dieser Domäne. Die C-Domäne besitzt eine Donor- und eine Akzeptorseite. Die Donor-Seite ist für die Bindung des Elektrophils (die Aminoacyl- oder Peptidyleinheit des vorangegangenen Moduls) verantwortlich. Zudem selektiert die Donorseite zwischen D- und L-Enantiomeren. In der Akzeptor-Seite wird das Nukleophil (die Aminosäure des eigenen Moduls) koordiniert.^{[59][60][61]} Kristallstrukturen von zwei C-Domänen wurden bis heute gelöst, VibH, einer diskreten C-Domäne, die an der Vibriobactin-Biosynthese beteiligt ist und zwei T-C-Didomänen der Module fünf und sechs aus TycC (s. Abb. 2-3).^{[34][62]} Anhand dieser Kristallstrukturen konnten erste Einblicke in den Mechanismus der C-Domänen gewonnen werden, bei dem der zweite Histidinrest des Kern-Motivs (C3) HHxxxxDG vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der Peptidbindungsknüpfung spielt (s. Abb. 2-5).^{[57][63]}

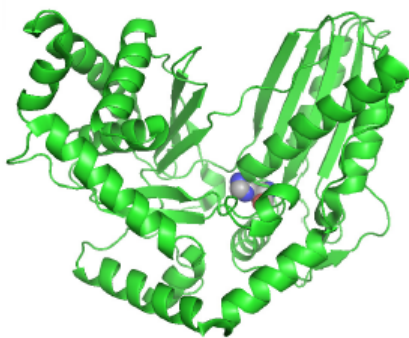


Abb. 2-5. Kristallstruktur der Kondensationsdomäne VibH

Kristallstruktur der diskreten C-Domäne VibH aus *Vibrio cholerae*. VibH ist an der Biosynthese des Siderophors Vibriobactin beteiligt. VibH weist eine V-förmige Struktur mit zwei Substratbindetaschen der Donor- und der Akzeptor-Seite auf. Hervorgehoben ist der zweite Histidinrest aus dem Kern-Motiv C3.

2.4.1.4 Kondensationsdomänen der Initiationsmodule

Der erste Baustein einer NRPS-Biosynthese wird auf die Initiationsmodule übertragen. Gewöhnliche Initiationsmodule haben, wie bereits beschrieben, (s. Abschnitt 2.4) einen verkleinerten Domänenaufbau als Elongationsmodule. Sie bestehen in der Regel nur aus einer A- und einer T-Domäne und wurde früher für die Standardform gehalten. Mit der zunehmenden Anzahl an NRPS-Sequenzen wurden jedoch weitere Arten von Initiationsmodulen identifiziert. Ein spezielles

Initiationsmodul wird insbesondere in NRPS-Systemen gefunden die Lipopeptide assemblieren. Diese Initiationsmodule besitzen zusätzlich eine C-Domäne am N-Terminus, die sogenannten Starter-C-Domänen oder auch als C^{III} bezeichnet.^[64] Durch phylogenetische Analyse diverser C-Domänen konnte gezeigt werden, dass die Starter-C-Domänen einen separaten Zweig bilden.^[65] C-Domänen der Elongationsmodule besitzen insgesamt sieben Kern-Motive (C1-C7). Anhand von Proteinsequenzvergleichen der gewöhnlichen C-Domänen mit Starter-C-Domänen konnte gezeigt werden, dass die Kern-Motive C2 und C4 die geringste und das Kern-Motiv C3 die höchste Homologie aufweist. Dieses C3-Motiv wird auch in anderen Acyl-ACP oder Acyl-CoA-abhängigen Transferasen angetroffen.^{[63][66]} Daher wird vermutet, dass diese C-Domänen die Bindungsknüpfung zwischen einer Fettsäure und einer Aminosäure katalysieren.^[67]

2.4.1.5 Weitere optionale Domänen nichtribosomaler Peptidsynthetasen

Neben den Kern-Domänen gibt es noch zusätzliche optionale Domäne, die zur Erhöhung der strukturellen Vielfalt von NRPS Produkten beitragen.

Peptidsynthetasen akzeptieren in der Regel Aminosäuren nur in ihrer L-Form, dennoch kommen in einigen NRPS-Produkten D-Aminosäuren vor (s. Abb. 2-1).^[68]

Die Umwandlung der Substrataminosäure von der L- in die D-Form erfolgt an Modulen mit einer E-Domäne.^{[69][70]} Die ca. 350 Aminosäurereste große E-Domäne invertiert das Stereozentrum am C- α Atom der gebundenen L-Aminosäure.^{[69][72][73]}

Ein weiteres Merkmal nichtribosomal synthetisierte Peptide sind Aminosäuren mit N-methylierten Resten. Eine dafür verantwortliche Einheit ist eine Domäne mit N-Methyltransferaseaktivität. Die ca. 450 Aminosäurereste große Methylierungsdomäne (M-Domäne) verwendet S-Adenosinmethionin (SAM) als Methylgruppendonor für die Methylierung der α -Aminogruppe der als Thioester aktivierten Aminosäure.^{[74][75][76]}

Weitere optionale Domänen sind die Reduktions- und Heterozyklisierungs-Domänen. Die Vorteile der intramolekularen Zyklisierung sind auf der einen Seite die positiven entropischen Effekte und auf der anderen Seite die verstärkte Stabilität des Moleküls gegenüber Peptidasen.^[77] Zusätzlich können nichtribosomale Peptide durch externe (*in trans*) Enzyme modifiziert werden, wie z. B. die Glykosylierung des Vancomycin-Grundkörpers.^[78]

Das Studium der nichtribosomalen Peptidbiosynthese führt zu einem zunehmenden Potenzial, die Produkte durch genetische Manipulation in gesteigerten Mengen oder gezielten strukturellen Veränderungen zu erhalten.^{[3][70][79][80][81]}

2.4.1.6 Thioesterasedomäne

Bei der nichtribosomalen Peptidbiosynthese gibt es zwei unterschiedliche Möglichkeiten zur Abspaltung des assemblierten Produkts. Erstens durch Hydrolyse, dies führt zu linearen Strukturen und zweitens durch Freisetzung einer zyklischen Verbindung durch intramolekulare Laktamisierung bzw. Laktonisierung (s. Abb. 2.4 D). Am C-terminalen Ende des letzten Moduls von Peptidsynthetasen befindet sich in der Regel eine Thioesterase, die für die Zyklisierung und damit die Freisetzung des fertigen NRPS-Produkts verantwortlich ist. Die Te-Domäne weist Sequenzhomologien zu Thioesterasen des Serinproteasen-Typs auf und enthält die typischen Motive der katalytischen Triade bzw. Diade.^{[82][83]} Die Te-Einheit übernimmt eine wichtige Aufgabe, z. B. führte die Deletion der Surfactin Te-Domäne zu einem fast vollständigen Erliegen der Peptidsynthese.^{[84][85]}

Bei einigen mikrobiellen Systemen wurde eine zweite, externe Thioesterase gefunden, die eine hohe Homologie zu Typ-II Fettsäure-Thioesterasen aus Vertebraten aufweist, wie z. B. SrfD bei der Surfactin-Biosynthese und GrsT bei der Gramicidin S-Biosynthese.^[86] Die niedrige Substratspezifität von 4'-Ppan-Transferasen erzeugt Fehlbeladungen von T-Domänen. Diese falsch beladenen Proteine werden von nachfolgenden Enzymen nicht erkannt und blockieren damit den Ablauf der ganzen nichtribosomalen Peptid-Biosynthese. Ein spezielles Enzym, die TEII (Thioesterase des Typs II) hat die Aufgabe die fehlbeladenen PCPs von Ihren Substraten zu befreien.^{[82][87]} Durch Genunterbrechungs-Studien konnten für Surfactin und das Polyketid Pikromycin gezeigt werden, dass die Genprodukte nicht essenziell, aber wichtig für hohe Produktausbeuten sind.^{[88][89]}

2.4.2 Strukturelle Einblicke in das Terminationsmodul SrfA-C

Durch die erstmals gelöste Kristallstruktur eines ganzen Moduls, dem Terminationsmodul der Surfactin-Synthetase SrfA-C mit vier Domänen (C-A-T-Te),

konnten erste Einblicke in die strukturelle Organisation der Domänen untereinander erhalten werden. Die C- und A-Domäne bilden ein katalytisches Plateau auf dessen Oberfläche die kleinere T-Domäne und die C-terminale-Subdomäne der A-Domäne angeordnet sind. Die Te-Domäne ist nur über eine kurze Linker-Region mit der T-Domäne verbunden (s. Abb. 2-6).

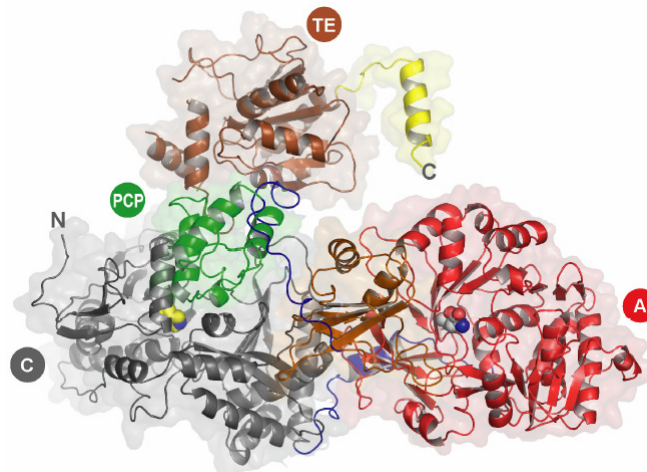


Abb. 2-6. Kristallstruktur des Terminationsmoduls von SrfA-C

Kristallstruktur eines Moduls bestehend aus vier Domänen: C-Domäne (grau), A-Domäne (rot: Kern-Domäne; orange: Sub-Domäne); PCP-Domäne (grün) und Te-Domäne (braun). Als Kugel-Modell sind dargestellt das gebundene Leuzin-Molekül und der katalytisch aktive Rest H147 der Kondensationsdomäne des Kern-Motivs C3 (aus Tanovic *et al* 2008).^[90]

2.4.3 Abweichungen vom Grundschema der modularen NRP-Biosynthese

Die anhand der als Paradigma aufgestellten Colinearitätsregel (s. Abschnitt 2.4) wird von einigen modularen NRPS-Systemen durchbrochen. Das Tyrocidin dargestellte NRPS-System ist ein Beispiel für nichtribosomale Peptidsynthetasen des A Typs. Das bedeutet, dass jedes Modul nur einmal zur Synthese des Produktes eingesetzt wird. Typ B NRPS sind iterative Systeme, die ihre Module mehr als einmal einsetzen. Die Anzahl der im Produkt eingebauten Bausteine ist in diesen Systemen kleiner als die Anzahl der Module. Ein Beispiel hierfür ist die iterative Biosynthese von Gramacidin S, die zusätzlich noch eine iterativ arbeitende Te-Domäne enthält.^[91]

Bei den Typ C NRP-Synthetasen handelt es sich um nichtlineare Systeme, die von der Standard-Abfolge der Elongationsmodule C-A-PCP gänzlich abweichen. Aus diesen Systemen resultieren meistens verzweigte Verbindungen. Zudem treten

häufig interne Zyklisierungen auf. Ein Beispiel dafür ist das verzweigte Tetrapeptid Siderophor Coelichelin aus *Streptomyces coelicolor*.^[92]

2.5 Weitere Thiotemplat-abhängige Biosynthesen

2.5.1 Die Polyketidsynthese - grundlegende Prinzipien

Die Polyketidsynthasen (PKS) lassen sich mit denen der nichtribosomalen Peptidsynthetasen vergleichen, denn sie folgen einer ähnlichen Logik.^{[93][94][95]} Zur Synthese eines Polyketids sind drei Enzyme von besonderer Bedeutung, die ähnlich wie bei NRPS auf großen Polypeptidketten in Modulen organisiert sein können. Die Acyltransferase-(AT)-Domäne übernimmt die Selektion des Substrats und ist vergleichbar mit der A-Domäne des NRPS-Systems. Die Substrate der AT-Domäne sind auf kleine Fettsäure-CoA-Moleküle beschränkt, die aus dem Primärmetabolismus des Organismus stammen. Verwendete Substrate sind Acetyl-CoA, Malonyl-CoA und Methylmalonyl-CoA, die als Bausteine für die komplexen PKS-Strukturen dienen. Die AT-Domäne überträgt ihr Substrat auf das zugehörige Acyl Carrier Protein (ACP), welches vergleichbar mit dem PCP der NRPS-Maschinerie ist und ebenfalls einen 4'-Ppan-Rest für dessen Aktivität benötigt. Anschließend wird das Substrat weiter auf einen Cys-Rest im aktiven Zentrum der Ketosynthase-(KS)-Domäne übertragen. Die KS-Domäne ist wiederum vergleichbar mit der C-Domäne des NRPS-Systems und katalysiert die Claisenkondensation zwischen zwei Substraten. KS-, AT- und ACP-Domänen stellen die Minimalausstattung der PKS dar. Nach Abschluss aller Elongationsschritte wird das Endprodukt durch Makrozyklisierung mittels einer Te-Domäne abgespalten. Erhöht wird die Komplexibilität der PKS-Produkte zusätzlich durch iterative Reaktionen sowie optionale Keton-Reduktion, Dehydrierung und/oder Enon-Reduktion.

Das vergleichbare biosynthetische Verhalten von PKS und NRPS zeigt sich besonders gut in NRPS/PKS hybriden Systemen. Dort arbeiten beide Systeme Hand in Hand, entweder zusammen als ein Proteintemplat oder als einzelständige Enzyme. Aus solchen Systemen entstehen gemischte NRP/PK-hybride Produkte wie z. B. Mycosubtilin (s. Abschnitt 2.7.1) oder Epithilone.^[96]

2.5.2 Die Fettsäurebiosynthese

Fettsäuren dienen sowohl als Energiespeicher, als auch als wichtiger Bestandteil von Zellmembranen oder Proteinen. PKS und die Fettsäuresynthasen (FASs) sind sich ähnlicher, als die NRP-Synthetasen zu den FASs, jedoch auch hier sind Gemeinsamkeiten zu erkennen.^[97] Die Fettsäurebiosynthese beginnt mit Malonyl-CoA-Einheiten, ähnlich wie bei der Polyketid-Synthese, und endet gewöhnlich in Fettsäuren mit einer geraden Anzahl von Kohlenstoffatomen, typischerweise zwischen 14 und 24 Einheiten.

Die Fettsäurebiosynthese beginnt mit der Übertragung von Malonyl-CoA auf den 4'-Ppan-Rest eines *holo*-ACPs. Dieser Vorgang wird durch die Malonyl/Acetyl-CoA-ACP-Transacylase (MAT) katalysiert.^[98] Die acylierte β -Ketoacyl-ACP-Synthase III katalysiert anschließend die Initiation der Kettenverlängerung mit Malonyl-CoA und Acetyl-CoA unter Freisetzung von Kohlendioxid, wodurch eine Verlängerung um zwei Kohlenstoffeinheiten des am ACP-gebundenen Acylrestes erreicht wird. In einer Reihe von weiteren Syntheseschritten wird das ACP-gebundene Intermediat am β -Kohlenstoffatom durch die β -Ketoacyl-ACP-Reduktase (KR) reduziert und durch die β -Hydroxyacyl-ACP Dehydratase (DH) dehydriert. Die Enoyl-ACP-Reduktase (ER) katalysiert anschließend die Reduktion zur β -CH₂-Gruppe. Durch weitere Ketosynthetasen erfolgt die Verlängerung der Acyl-Kette bis zur spezifischen Größe.^{[99][100]}

Das zentrale Protein, wie auch bei NRPS und PKS, stellt das Carrier-Protein (CP) dar, das die wachsende Einheit, bei der Fettsäurebiosynthese die Fettsäure, von einem katalytischen Zentrum zum anderen transportiert.

Die Struktur der verschiedenen FASs und PKSs des Typ I sind mit ihrem multimodularen Aufbau vergleichbar mit denen der NRPS-Proteine und können oft eine Größe von mehreren 100 Kilodalton erreichen. Typ II FASs und PKSs besitzen die gleichen funktionellen Einheiten wie die des Typ I, jedoch ist der Aufbau der katalytischen Einheiten eine Polypeptidkette, welches mit dem entsprechenden ACP *in trans* arbeitet.^[95]

2.6 Phosphopantetheinyl-Transferasen

Bei Polyketid-, Fettsäure-Synthasen und Peptidsynthetasen sind an der Übertragung von Acyl-Gruppen Carrier-Proteine beteiligt. Diese CPs benötigen einen 4'-Ppan-Kofaktor für deren katalytische Aktivität. Die Übertragung dieses Kofaktors und damit die Änderung von der inaktiven *apo*-Form in die aktive *holo*-Form des entsprechenden CPs erfolgt durch 4'-Ppan-Transferasen.^[101] Die 4'-Ppan-Transferasen übertragen die Phosphopantethein-Einheit von Coenzym A auf den konservierten Serin-Rest des Thiolierungsmotivs.

Für die meisten CPs wurde eine spezifische 4'-Ppan-Transferase identifiziert. Organismen, die mehr als einen 4'-Ppan-abhängigen Stoffwechselweg aufweisen, besitzen häufig mehr als eine Transferase. Ein am besten charakterisierter Vertreter der 4'-Ppan-Transferasen ist Sfp aus *B. subtilis*. Sfp besitzt eine hohe Substrattoleranz und wird daher häufig für *in vitro* und *in vivo* Modifizierungen eingesetzt.^[102-105] Zusätzlich akzeptiert Sfp auch eine Vielzahl CoA-derivatisierter Substrate. Die Synthese solcher CoA-Analoga erfolgt mittels Michael-Addition. Aus diesem Grund wird Sfp zur Modifizierung von z. B. Reportergruppen an Carrier-Proteinen eingesetzt.^[106]

2.7 Fettsäurehaltige nichtribosomale Peptide

Die N-terminale Lipidierung ist ein bekanntes Merkmal von vielen NRPS-Produkten wie z. B. von Surfactin, Fengycin, Syringomycin, Mycosubtilin und den sauren Lipopeptiden wie z. B. Daptomycin, Friulimicin und CDA und verleiht diesen Verbindungen einen amphiphilen Charakter (s. Abb. 2-7).

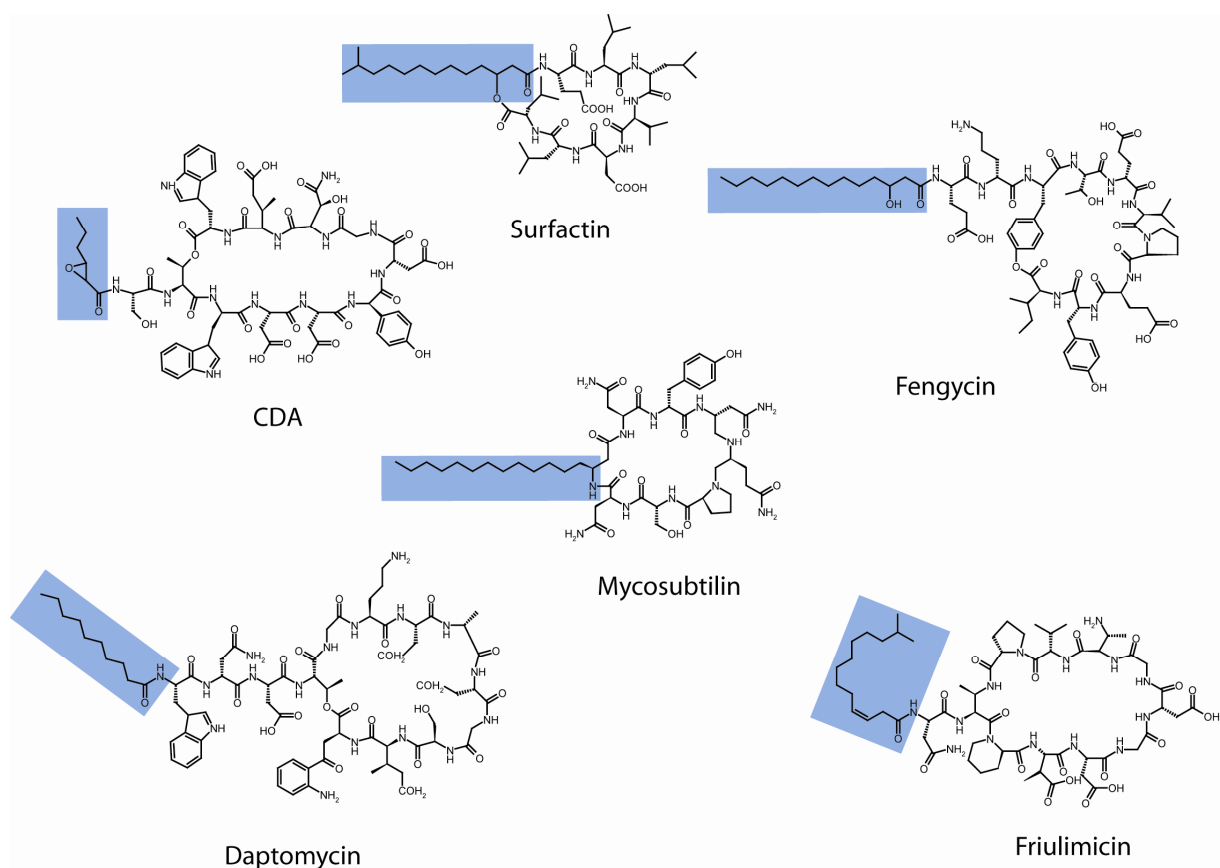


Abb. 2-7. Nichtribosomale zyklische Lipopeptide

Gezeigt ist eine Auswahl zyklischer Lipopeptide, die nichtribosomal synthetisiert werden. Die Lipid-Reste sind blau unterlegt. Surfactin aus *Bacillus subtilis*; CDA aus *Streptomyces coelicolor*, Fengycin aus *Bacillus subtilis*, Mycosubtilin aus *Bacillus subtilis*, Daptomycin aus *Streptomyces roseosporus* und Friulimicin aus *Actinoplanes friuliensis*.

Diese Verbindungsklasse besitzt zum Teil sehr bemerkenswerte physikochemische Eigenschaften.^{[107][108]} Die Lipid-Komponente hat eine wichtige Bedeutung, denn diese hydrophobe Einheit ermöglicht die Wechselwirkung mit Zellmembranen des konkurrierenden Organismus. Die Strukturen dieser Fettsäuren können enorm variieren. Es treten unverzweigte, verzweigte, hydroxylierte, Fettsäuren mit unterschiedlichen Kettenlängen, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren auf. Je nach Beschaffenheit dieser Acyleinheit werden antimikrobielles und toxisches Verhalten stark beeinflusst.^{[109][110]}

Im Kontrast zu der gut untersuchten NRPS-Maschinerie und der Bildung von peptidischen Strukturen ist jedoch sehr wenig über den Mechanismus der Verknüpfung des Fettsäuremoleküls mit dem Peptid-Rückgrad bekannt. Im Folgenden werden zwei bekannte Systeme bezüglich ihrer Acylierungsreaktion genauer betrachtet.

2.7.1 Acylierungsreaktionen von Mycosubtilin und CDA

Mycosubtilin: Mycosubtilin aus *B. subtilis* ist ein Oktapeptid, dessen β -Amino-Fettsäure die intramolekulare Laktambildung sicherstellt. Die erste Synthetase MycA ist ein hybrides System, das N-terminal aus einer PKS-Einheit und C-terminal aus einer NRPS-Einheit besteht. Die PKS-Einheit ist für die Integration und die Verlängerung der Acyl-Komponente verantwortlich. Ein *in trans* agierendes freistehendes Protein FenF (Malonyl-CoA-Transacylase) stellt die Malonyl-Spezies zur Kettenverlängerung bereit.^{[111][112]} In weiteren Syntheseschritten katalysiert durch MycA, MycB und MycC erfolgen Aufbau und abschließende Freisetzung des Produktes (s. Abb. 2-8).

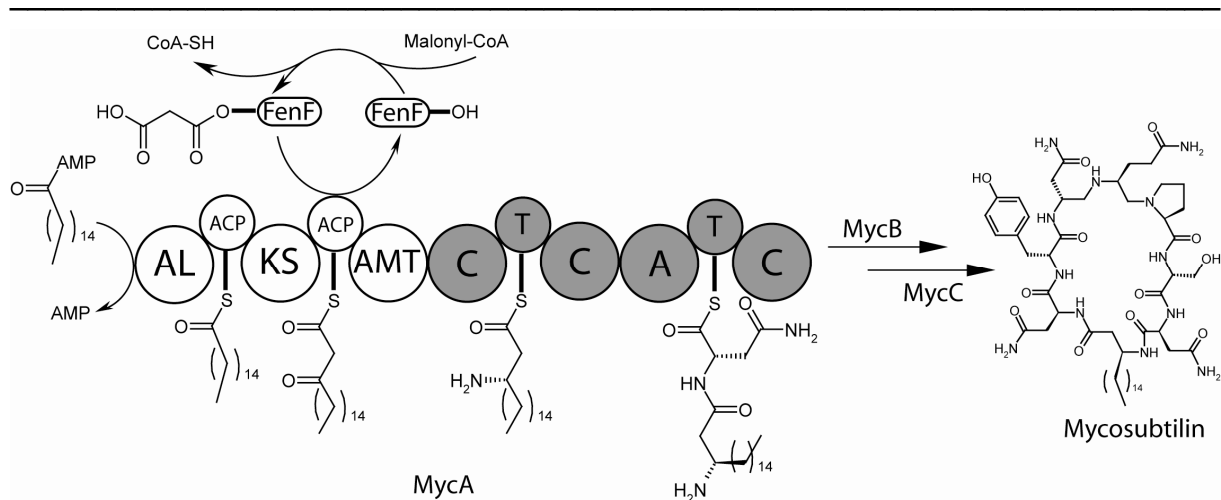


Abb. 2-8: Initiationsreaktion der Mycosubtilin-Biosynthese

MycA, die erste Synthetase des Mycosubtilin-Biosyntheseclusters besteht aus PKS- (farblos) und NRPS-Elementen (grau). Al-Domäne: Acyl-Ligase; ACP: Acyl-Carrier-Protein; KS: Ketosynthetase; AMT: Aminotransferase.

Kalzium-abhängige Antibiotikum: Das Kalzium-abhängige Antibiotikum assembliert von *S. coelicolor* (englisch: calcium-dependent antibiotic: CDA) stellt wiederum eine besondere Verbindung von fettsäurehaltigen Lipopeptiden bezogen auf die Acyl-Komponente dar. Allgemein werden in Lipopeptiden Strukturisomere bezüglich der Lipideinheit gefunden. Im CDA-Molekül handelt es sich jedoch um eine invariante 2,3-Epoxy-hexansäure die konserviert in allen identifizierten CDA-Derivaten vorliegt. Im *fab*-Operon stromabwärts des CDA-Biosynthesecusters konnten Gene identifiziert werden, deren Produkte am Aufbau der Fettsäure involviert sind. Es wird postuliert, dass die Enzyme FabF3 und FabH4 zusammen mit

Enzymen des Fettsäurestoffwechsels die Synthese der spezifischen Hexansäure katalysieren. Die Biosynthese erfolgt vermutlich an einem ACP, das ebenfalls in dem *fab*-Operon codiert vorliegt. ^{[103][114]} Die Oxidase HxcO führt wahrscheinlich die Doppelbindung ein und die Monooxygenase HcmO epoxidiert die ungesättigte C-C-Bindung.^[115] Die Übertragung der 2,3-Epoxy-hexanoyl-Komponente, kovalent gebunden am ACP, auf das Initiationsmodul ist bis heute noch nicht geklärt (s. Abb. 2.9).

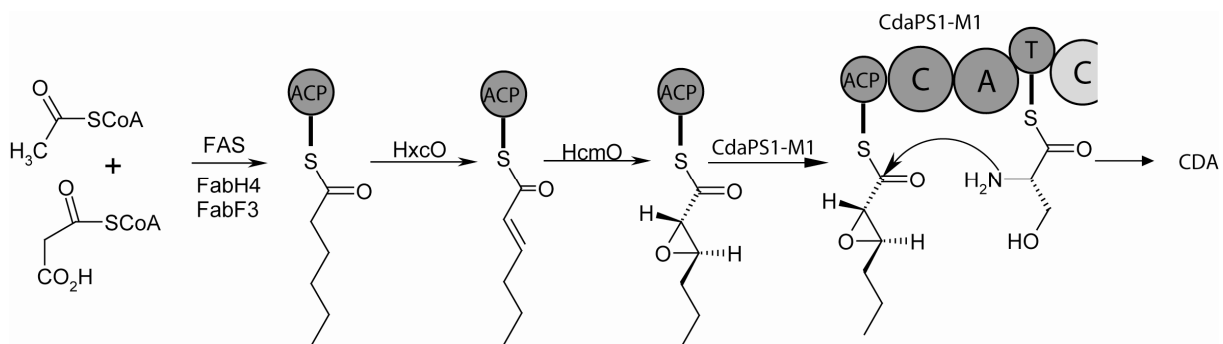


Abb. 2-9. CDA-Initiationsreaktion

Dargestellt ist der postulierte Mechanismus der Biosynthese von 2,3-*trans*-Epoxy-hexansäure durch die FAS-Enzyme und die Epoxidierung durch HxcO und HcmO. Anschließend erfolgt die Übertragung der ACP-gebundenen Acyl-Komponente auf das Initiationsmodul (CdaPS1-M1). In weiteren Schritten erfolgt die Biosynthese von CDA.

2.7.2 Azide Lipopeptid-Antibiotika

Ein besondere Klasse der Fettsäure-haltigen zyklischen NRPS-Produkte sind die aziden Lipopeptide. Diese Naturstoffklasse mit ihrer außerordentlichen strukturellen Diversität stellt ein weiteres Beispiel der hohen Strukturvielfalt von NRPS-Produkten dar. Wichtige Kandidaten sind Daptomycin aus *Streptomyces roseosporus*^[116], CDA aus *Streptomyces coelicolor*^[114] und A54145 aus *Streptomyces fradiae*^[117]. Diese Naturstoffe stellen individuelle Verbindungen dar, denn sie unterscheiden sich durch die N-terminale Fettsäure und die Zusammensetzung des Peptidrückgrads. Jedoch gibt es auch Gemeinsamkeiten: Die Positionen der D-konfigurierten Aminosäuren sind in diesen Strukturen hoch konserviert. Zusätzlich sind zwei Aspartatreste an gleicher Ringposition im Peptidrückgrad lokalisiert. Die Bezeichnung "azide" beruht auf der Integration von sauren Aminosäuren in das Peptidgerüst.

2.7.2.1 Das azide Lipopeptid-Antibiotikum Daptomycin

Daptomycin weist bakteriozide Aktivität gegen Vancomycin-resistente Erreger (VRE), Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme und Penicillin-resistente *Streptococcus pneumoniae* (PRSP)-Stämme auf.^{[118][119]} Damit hat dieser Wirkstoff eine große therapeutische Bedeutung und wurde in den USA im Jahr 2003 durch die FDA unter dem Handelsnamen Cubicin® (Daptomycin zur Injektion) zur Behandlung von Hautinfektionen, die durch Gram-positive Bakterien hervorgerufen werden, zugelassen. Für die antibiotische Aktivität sind sowohl die Lipideinheit, als auch die Bestandteile der peptidischen Ringstruktur ausschlaggebend.

2.7.2.2 Die Biosynthese von Daptomycin

Streptomyces roseosporus assembliert natürlicherweise A21978C1-3. Dieser Naturstoff besteht aus einem Komplex verschiedener Lipopeptide, die sich u.a. in der Fettsäurezusammensetzung unterscheiden.^[109] Bei der Acyl-Komponente von Daptomycin handelt es sich um die Dekansäure. In marginalen Mengen wird Daptomycin auch von *S. roseosporus* selbst assembliert. Wird jedoch einem A21978C-produzierenden Stamm ein Überschuss an Dekansäure ins Nährmedium gegeben, so wird ein deutlicher Anstieg der Daptomycin-Produktion verzeichnet. Allgemein besteht Daptomycin aus insgesamt 13 Aminosäuren. 10 Aminosäuren bilden über eine intramolekulare Esterbindung die peptidische Ringstruktur aus. Die Esterbindung wird von der OH-Gruppe des Threonins mit dem C-terminalen Ende des Kynurenins (Kyn) erzeugt. Die restlichen drei Aminosäuren, wie auch die Fettsäure, gehören zur Seitenkette (s. Abb. 2-10).

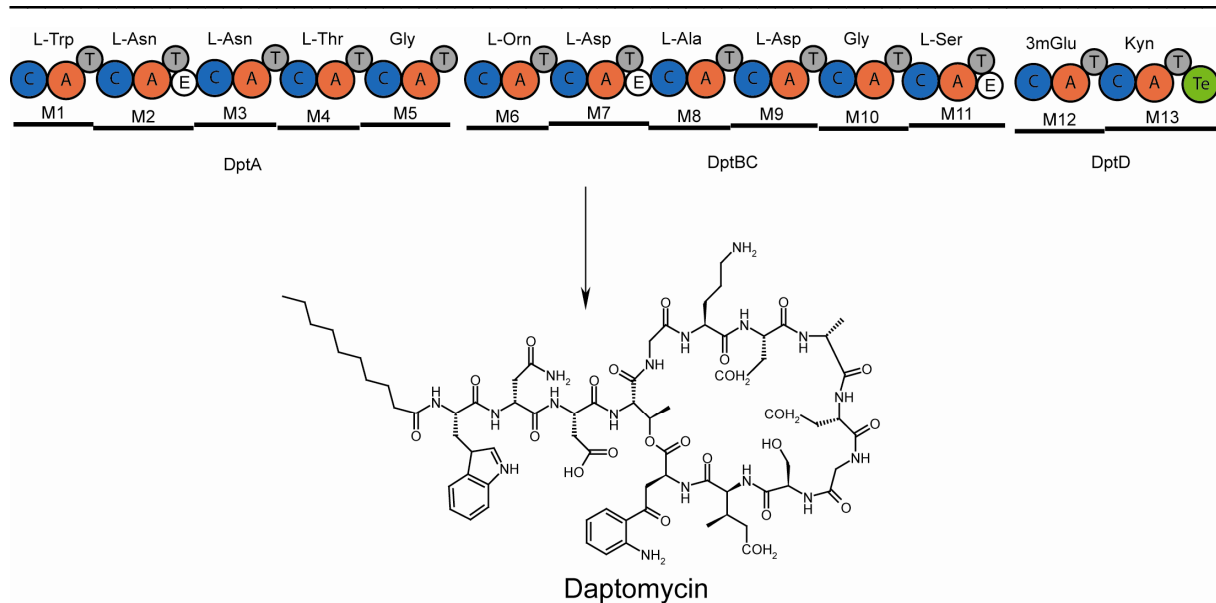


Abb. 2-10. Die nichtribosomale Biosynthese von Daptomycin

Das Daptomycin Biosynthesecuster besteht aus drei Synthetasen DptA, DptBC und DptD, die wiederum aus insgesamt 13 Modulen aufgebaut sind. Modul 2, 7 und 11 enthalten je eine Epimerisierungsdomäne.

Der Biosynthesecuster des Daptomycins besteht aus drei großen Protein-Einheiten DptA, DptBC und DptD.^{[109][120][121]} Diese Synthetasen sind das Ergebnis des Translationsprodukts einer einzigen langen mRNA.^[122] Drei der insgesamt 13 Module haben eine *in cis* agierende E-Domäne, welche die L-Aminosäuren in die D-Isoform epimerisieren. Die letzte Synthetase DptD enthält eine Te-Domäne, die verantwortlich für die intramolekulare Zyklisierung und Abspaltung des finalen Produktes ist.^{[5][76]}

2.7.2.3 Der Wirkungsmechanismus von Daptomycin

Die Gründe weshalb Daptomycin so ein wirkungsvolles Antibiotikum darstellt, werden in der Literatur kontrovers diskutiert und sind letztendlich auch noch nicht vollständig verstanden. Ein intensiv diskutierter Ansatz ist, dass die Fettsäureeinheit des Wirkstoffs mit der Zellmembran der entsprechenden Zielorganismen in Abhängigkeit von Kalzium-Ionen interagiert und sich dort durch Wechselwirkung mit den Membranlipiden integriert.^{[123][124][125]} Die Einlagerung ist dabei fast ausschließlich von der Kettenlänge des Fettsäurerests, weniger jedoch von dem hydrophilen Peptidrückgrad abhängig.^[126] Mehrere Daptomycin-Moleküle bilden Aggregate in der

Zytoplasma-Zellmembran des Bakteriums die wie Ionenkanäle agieren. Dadurch kommt es zu einem Efflux von Kaliumionen. Diese Depolarisation der Zellmembran führt letztendlich zum Zelltod des Gram-positiven Organismus.^[127] Diese These wird unterstützt durch diverse NMR-Studien.^{[128][129]} Diese Studien zeigten, dass sich die Konformation von Daptomycin nach der Bindung von Kalzium-Ionen ändert und dadurch vermutlich die Interaktion mit neutralen oder aziden bakteriellen Membranen erleichtert wird (s. Abb. 2-11).

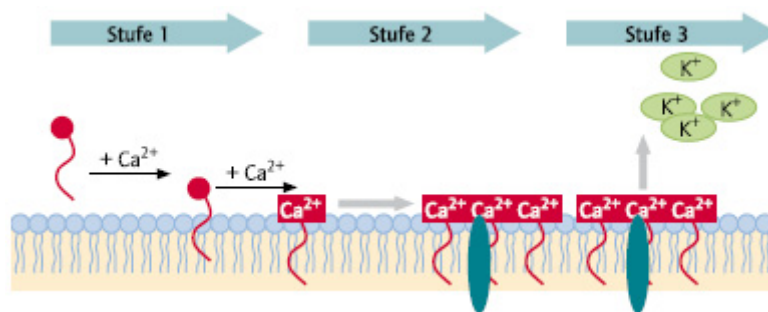


Abb. 2-11: Wirkungsmechanismus von Daptomycin

In der ersten Stufe lagern sich Dptomycin-Moleküle mit der Lipid-Einheit in die Zytoplasmamembran von Gram-positiven Bakterien ein. Dieser Prozess ist Kalziumionen-abhängig. In der zweiten Stufe kondensieren mehrere Daptomycin-Moleküle und bilden einen Kanal. In der dritten Stufe erfolgt der Efflux von Kaliumionen und es kommt zum Erliegen der Protein-, DNA und RNA-Synthese. Die Zelle stirbt ab, ohne dass eine deutliche Lyse stattgefunden hat (entnommen aus Wiedemann, Chemother J 2008)^[130].

2.7.2.4 Die Lipoinitiation von Daptomycin

Über den Mechanismus der N-terminalen Lipidierung von Daptomycin ist bis heute wenig bekannt. Ein Erkennungsmerkmal von NRPS-Systemen die Lipopeptide synthetisieren ist, dass das erste Modul eine C-Domäne am N-Terminus enthält. Dies ist auch beim Daptomycin der Fall. Weiter konnten im Gencluster des Operons von Daptomycin keine PKS- oder FAS-ähnlichen Elemente identifiziert werden. Stattdessen wurden wenige kb stromaufwärts des entsprechenden Genclusters zwei diskrete Gene identifiziert, deren Produkte DptE und DptF eine Beteiligung an der Fettsäuraktivierung und -übertragung zugeschrieben wird (s. Abb. 2-12).^{[120][114][131]}

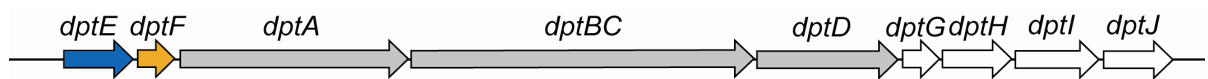


Abb. 2-12. Organisation des *dpt*-Operons

Farbig dargestellt sind die Gene, deren Produkte vermutlich an der Aktivierung und Übertragung der Fettsäure von Daptomycin involviert sind. In grau dargestellt sind die NRPSs zur Biosynthese des Peptidrückgrats von Daptomycin. In weiß sind Gene dargestellt, deren Produkte an weiteren Modifikationen von Daptomycin beteiligt sind.

Durch Homologievergleiche wurde gezeigt, dass DptE hoch konservierte Bereiche enthält, die typisch für Adenylat-bildende Enzyme sind. In *Mycobacterium tuberculosis* wurden Enzyme identifiziert, die zur Klasse der langkettigen Acyl-AMP-Ligasen (FAALs) gehören. FAALs katalysieren die Aktivierung von Fettsäuren als Adenylat, ähnlich der A-Domänen. Die identifizierten FAALs aus *M. tuberculosis* übertragen die Fettsäurekomponente auf CPs des korrespondierenden PKS-Systems.^[132] Im Vergleich zu Daptomycin ist kein integriertes CP, welches diese Funktion übernehmen könnte, vorhanden. Allerdings besitzt DptF hohe Homologien zu ACPs und die Vermutung liegt nahe, dass durch Protein-Protein-Interaktion mit dem ersten Modul (DptA-M1) die Fettsäure übertragen wird. Die N-terminale C-Domäne der Peptidsynthetase DptA übernimmt möglicherweise, wie es schon beim Surfactin bekannt ist (s. Abschnitt 2.7.3.2), die Kondensationsreaktion zwischen Tryptophan, das Substrat der A-Domäne des Starter-Moduls und der entsprechenden DptF-gebundenen Fettsäure. In der vorliegenden Arbeit wurden die Funktionen dieser putativen Enzyme *in vitro* genauer untersucht.

2.7.3 Das zyklische Lipoheptapeptid Surfactin

Surfactin ist ein von *B. subtilis* produziertes hoch aktives Biotensid. Dieser NRPS-assemblierte Naturstoff besteht aus sieben α -Aminosäuren und einer β -Hydroxy-Fettsäure, die über eine C-terminale Amid- und einer N-terminalen Lactonbindung mit den beiden Enden der Heptapeptidkette verbunden ist.^[133] In der Natur kommt Surfactin als ein Gemisch verschiedener Strukturisomere vor, dessen Zusammensetzung durch externe Faktoren, wie z. B. Nährmedienzusammensetzung oder physikalisch-chemische Faktoren beeinflusst wird.^[134] Isoliertes Surfactin variiert somit in der Länge des Fettsäurerestes (C13-C15-Einheiten), als auch in der

Zusammenstellung der Aminosäurebausteine. An der Position sieben wurde statt L-Leucin auch L-Valin und L-Isoleucin identifiziert.

Aufgrund des hydrophoben Rests und den polaren Aminosäuren besitzt Surfactin amphotere Eigenschaften und ist dadurch sowohl in polaren als auch in unpolaren Lösungsmitteln löslich. In wässriger Phase zeigt Surfactin eine charakteristische Pferdesattel-Konformation und ist in der Lage ab einer Konzentration von 20 μM die Oberflächenspannung von Wasser von 72 mJ/m^2 nach 27 mJ/m^2 zu reduzieren. Aus diesem Sachverhalt kann eine Begründung der antibakteriellen und antitumoralen Eigenschaften dieses Naturstoffes abgeleitet werden.^{[133][135][136][137][107][108]} Die antibiotische Wirkung hängt damit zusammen, dass Surfactin ab einer gewissen Konzentration, wie ein Detergens wirkt und die Phospholipid-Zellmembran zerstört. Weiter sind antivirale und antimycoplasmische Eigenschaften von Surfactin bekannt.^[138]

2.7.3.1 Die Biosynthese von Surfactin

Die Biosynthese von Surfactin beginnt in der logarithmischen Wachstumsphase von *B. subtilis* und erstreckt sich über die gesamte Wachstumszeit. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde das 27 kb große *srf*-Operon, das die entsprechenden NRPS-Einheiten codiert, identifiziert und analysiert (s. Abb. 2-13).^{[84][139][140]}

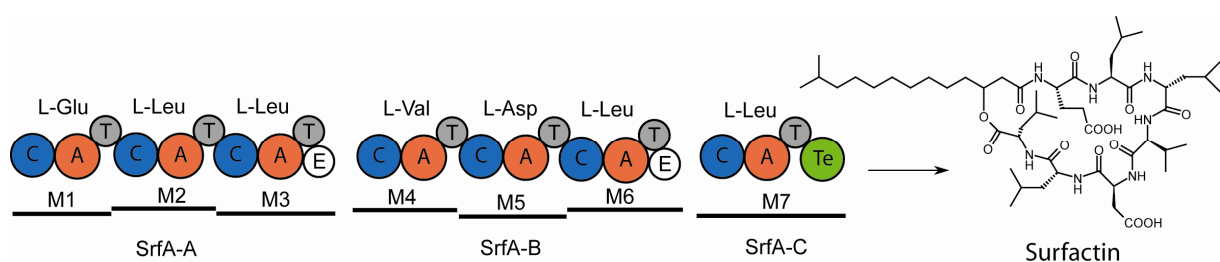


Abb. 2-13. Die nichtribosomale Biosynthese von Surfactin

Surfactin wird durch drei NRPSs SrfA-A, SrfA-B und SrfA-C biosynthetisiert. Die Synthetasen bestehen aus insgesamt sieben Modulen. Modul 3 und 6 weisen jeweils eine E-Domäne auf. Das Terminationsmodul SrfA-C katalysiert die intramolekulare Zyklisierung und Abspaltung des Produktes.

Das Proteintemplat zur Surfactinbiosynthese besteht aus drei großen nichtribosomalen Peptidsynthetasen: SrfA-A (402 kDa), SrfA-B (401 kDa) und SrfA-C (144kDa). Diese Synthetasen bestehen insgesamt aus sieben Modulen. Das erste Modul von SrfA-A beginnt mit einer Kondensationsdomäne. Diese C-Domäne katalysiert die Bildung der Peptidbindung, wobei sich β -Hydroxy-Acylglutamat als

Initiationsprodukt bildet.^[141] Zwei optionale Epimerisierungs-Domänen, lokalisiert jeweils am C-Terminus von SrfA-A und SrfA-B, katalysieren die Konvertierung von L-Leu zu D-Leu an den Positionen drei und sechs im Molekül. Die Abspaltung des zyklischen Lipopeptids wird durch die Te-Domäne des C-terminalen Terminationsmoduls 7 katalysiert. Ca. 4 kb stromabwärts vom *srfA*-Operon befindet sich ein Gen *sfp*, welches für die 4'-Ppan-Transferase Sfp codiert. Dieses Enzym besitzt die Aufgabe die inaktiven *apo*-T-Domänen in die aktive *holo*-Form zu konvertieren.^[101]

2.7.3. Die Lipoinitiation von Surfactin

Bisherige Untersuchungen zur Initiationsreaktion von Surfactin zeigten, dass die drei Surfactin-Synthetasen alleine nicht in der Lage sind, die *in vitro* Surfactin-Biosynthese zu initiieren. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Initiation der Peptidbiosynthese durch Übertragung des CoA-Thioesterderivats der β -Hydroxy-Fettsäure auf die erste Aminosäure L-Glutamat, durch SrfA-A aktiviert, initiiert werden kann.^{[68][142]}

Dabei katalysiert vermutlich die C-Domäne des ersten Moduls von SrfA-A die kovalente Bindungsknüpfung zwischen der CoA-derivatisierten Fettsäure und der ersten Aminosäure Glutamat. Es bleibt jedoch die Frage offen, wie die Übertragung der Fettsäure auf das erste Modul stattfindet. Eine Beteiligung einer CoA-abhängigen Acyltransferase für den Transfer des Fettsäuresubstrates wird vermutet. Studien der Arbeitsgruppe von Vater und Mitarbeitern postulieren, dass die Fettsäure durch eine ca. 40 kDa große, CoA-abhängige Acyltransferase übertragen werden könnte.^[142] Jedoch konnte dieses potenzielle Protein auch in weiteren Untersuchungen weder isoliert noch identifiziert werden.^[141] Auch aus der bekannten Genomsequenz von *B. subtilis* ergaben sich keine Hinweise auf eine putative Acyltransferase, die der Initiationsreaktion der Surfactin-Biosynthese zugeordnet werden könnte.^[143] Weitere Studien postulieren eine Beteiligung der TE II (SrfA-D), welche an der Korrektur falsch beladener Synthetasen verantwortlich ist.^[88] Bis heute bleibt die Initiationsreaktion der Surfactin-Biosynthese weiter ungeklärt. Die vorliegende Arbeit jedoch liefert neue Ansätze zur Aufklärung des Mechanismus der Lipidierung von Surfactin.

2.8 Aufgabenstellung

Ein allgemeines Ziel dieser Arbeit bestand darin, die biosynthetischen Aspekte der Diversität von Fettsäure-haltigen NRPS-Produkten besser zu verstehen. Da die Mechanismen der Initiationsreaktionen von nichtribosomal assemblierten Lipopeptid-Antibiotika weitestgehend unbekannt sind, sollten anhand der Modellsysteme Daptomycin und Surfactin dieser Synthesevorgang genauer untersucht werden. Im Falle von Daptomycin standen Untersuchungen der Enzyme DptE und DptF im Vordergrund. Im Falle von Surfactin sollte sich die Arbeit im Wesentlichen auf die Identifizierung und biochemische Charakterisierung putativer Enzyme, die an der Initiations-Reaktion involviert sein können, konzentrieren.

3 Material

3.1 Geräte

Tab. 3-1. Verwendete Geräte mit Herstellerangaben und Typenbezeichnung

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
Autoklav	<i>Tuttnauer</i> 5075 ELV <i>Fedegari</i> Autoclavi SPA FVA3/A1
Analysewaagen	<i>Sartorius</i>
Brutschrank	<i>Köttermann</i> 2736
Dokumentationseinheit von DNA-Agarosegelen	<i>Cybertech</i> CS1 Videokamera <i>Mitsubishi</i> Video Copy Processor
Elektrophorese	Thermodrucker Agarosegelkammern aus Plexiglas (Hausproduktion; <i>Philipps-Universität Marburg</i> , Fachbereich Chemie)
Elektroporationsgerät	<i>BioRad</i> Gen Pulser II
ESI-MS-System	<i>Hewlett Packard</i> Series 1100
FPLC-Säulen	<i>Amersham Bioscience</i> Ni ²⁺ -NTA-Säulen und HiTrap™ Desalting
FPLC-System	<i>Amersham Pharmacia</i> FPLC-System bestehend aus: Gradienten-Programmer GP-250, Pumpe P-500 (2-fach), <i>Uvicord</i> Opt. Einheit UV-1 (mit 280 nm Filter), <i>Uvicord</i> Kontrolleinheit UV-1, 2-Kanal- Flachbettschreiber REC-102, Injektionsventil V-7, 3-Wege Magnetventil PSV-100, Fraktionssammler FRAC-100
French-Press	<i>SLM Amicon</i> French-Pressure Cell Press 5.1 <i>Thermo Spectronic</i> Standard Cell 40 KP
FT-ICR	<i>Thermo Scientific</i> Finnigan LTQ-FT
Gefriertrocknungs-Anlagen	<i>Edwards</i> Freez Dryer Super Modulyo <i>Christ</i> Alpha 2-4 LSC

Tab. 3-1. Fortsetzung

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
Heitzschüttler	<i>Eppendorf</i> Thermomixer Comfort
HPLC-System	<i>Hewlett Packard</i> Agilent Series 1100 HPLC-System mit DAD-Detektor, Vakuumentgaser, quaternärer Pumpe, Autosampler, HP-Chemstation
HPLC-Trennsäulen	<i>Macherey und Nagel</i>
Kulturroller	<i>New Brunswick Scientific</i> TC-7
Luftschüttler	<i>New Brunswick Scientific</i> Series 25
Incubator	Shaker; <i>Innova</i> 4300 Incubator Shaker <i>INFORS</i> HT Multitron
MALDI-TOF	<i>Bruker</i> FLEXIII
NanoDrop	<i>PEQLab</i> ND-1000
Netzgeräte	<i>Pharmacia</i> EPS 3501 XL <i>Bandelin</i> Sonoplus HD 200
PCR-Maschine	<i>Eppendorf</i> Mastercycler Personal
pH-Meter	<i>Schott</i> CG 840
Pipetten	<i>Eppendorf</i> Research Serie
Photometer	<i>Amersham Pharmacia</i> Ultrospec 3000
UV/Visible	Spectrophotometer und <i>Amersham</i> <i>Bioscience</i> Ultrospec3100Pro
Reinstwasseranlage	<i>Seral</i> Seralpur Pro90CN
Software	<i>Adobe</i> Illustrator 10.0 <i>GATC</i> Lasergene DNASTar 5.0 <i>McCarthy</i> Chromas 1.45 <i>Microsoft</i> Office XP <i>Sci Ed Central</i> Clone Manager 6 <i>SigmaPlot</i> Enzyme Kinetics 1.1
Speed-Vac	<i>Uniequip</i> Univapo 150 H
Sterilbank	<i>Antair</i> BSK
Szintillationszähler	<i>Packard</i> 1900CA TRI-CARB Liquid
Scintillation	Analyzer

Tab. 3-1. Fortsetzung

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
Thermoblock	<i>Teche Dri-Block® DB 2A</i>
Ultraschallbad	<i>Bandelin, Sonorex Super RK103H</i>
Vakuummeltrockner	<i>Fisherbrand FSGD-5040</i>
Vortexer	<i>Scientific Industries Vortex Genie2</i>
Wasserbad	<i>Infors Aquatron Rundschüttler</i>
Wasserschüttler	<i>Infors Aquatron Rundschüttelmaschine</i>
Zentrifugen	<i>Eppendorf Centrifuge 5415D</i> <i>Heraeus Biofuge Pico und Megafuge 1.0R</i> <i>Sorval RC26Plus und RC5BPlus</i>

3.2 Feinchemikalien und Lösungsmittel

Chemikalien, die in der nachfolgenden Tabelle nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von der *Firma Merck* (Darmstadt), *Sigma-Aldrich* (Seelze, Steinheim) in p.a. Qualität bezogen.

Tab. 3-2. Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Hersteller (Vertriebsort)	Produkte
Agilent Technologies (Böblingen, Deutschland)	DHB-Matrix
Amersham Bioscience European GmbH (Freiburg, Deutschland); GE Healthcare	Agar Nr. 1, Antibiotika, Coomassie Brilliant Blau G und R250, Hefeextrakt, IPTG, Proteinkinase K, Lysozym
Bachem (Weil am Rein, Deutschland)	geschütztes Tryptophan
Brand (Wertheim, Deutschland)	Einmalküvetten Plastbrand PS
Difco (Detroit, USA)	Nutrient Broth, Casamino acids
Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	1,5 mL und 2,0 mL Reaktionsgefäße
Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)	synthetische Oligonukleotide (Primer)
Eurogentech (Seraing; Belgien)	Agarose, Elektroporationsküvetten

Tab. 3-2. Fortsetzung

Hersteller (Vertriebsort)	Produkte
Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)	PageRuler Unstained Protein Ladder
Fluka (Neu-Ulm)	TEMED, SDS
Finnzymes (Espoo, Finnland)	Phusion DNA-Polymerase
GATC (Konstanz, Deutschland)	DNA-Sequenzierung
Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)	<i>E. coli</i> Stämme (TOP10, BL21); pBAD102/D-TOPO Expression Kit
Merck4Bioscience (Nottingham, Großbritannien)	HBTU, pET28a(+)-Vektor
NEN (Köln, Deutschland)	[³² P]-Pyrophosphat
New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)	Desoxyribonukleotide (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 1 kb-DNA-Ladder, Proteinmarker, Restriktionsendonukleasen
Millipore (Bedford, USA)	Dialysemembran; Amicon Ultra-Konzentratoren
MP Miomedicals (Illkirch, Frankreich)	Coenzym A Trilithiumsalz
Oxoid (Cambridge, Großbritannien)	Agar Nr. 1, Bactotrypton
Qiagen (Hilden, Deutschland)	Ni ²⁺ -NTA-Agarose, QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick-spin PCR Purification Kit, tip 20/100-Anionentauschersäulen, Plasmidpräparationskit
Roth (Karlsruhe, Deutschland)	Acrylamid für SDS-PAGE, β-Mercaptoethanol, Ethidiumbromid, Harnstoff, Glycin, Isopropanol
Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)	Pipettenspitzen
Schleicher und Schüll (Dassel, Deutschland)	Sterilfilter, Whatmann-3MM Papier
Serva (Heidelberg, Deutschland)	Bromphenolblau, Triton X-100, Bisacrylamid
Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)	Glycerol, N-Acetylcysteamin, SDS, TEMED, trockene Lösungsmittel, Arabinose
Stratagene (Heidelberg, Deutschland)	<i>E. coli</i> Stamm ArcticExpress™

3.3 Enzyme

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen, DNA-modifizierende Enzyme und Proteinasen wurden von der Firma NEB (New England Biolabs) bezogen. Die Enzymreaktionen wurden nach den Angaben des Herstellers gemacht.

3.4 Primer

Primer wurden von der Firma GATC synthetisiert. Alle verwendeten Primer sind im Folgenden gelistet.

Tab. 3-3. Verwendete Primersequenzen, Benennung und Schmelztemperaturen

Name	Sequenz 5' → 3'	T_m	Beschreibung
5'kan783	ATA ATC GAT AGG TGA TGA	60°C	Amplifikation der <i>kan</i> -Kassette aus pDG783
3'kan783	TAG GTA AGA TTA TAC TAC TTA CCG GGG TAT GAC CAT GAT TAC GAA TTC	60°C	
5'tet1514	TAT ACT AGT GAA TTG CCG GCG ATA TC	56°C	Amplifikation der <i>tet</i> -Kassette aus pDG1524
3'tet1514	TTA CCG CGG CAT GAT TAC GCC AAG CTC	63°C	
5'spc1726	TAT ACT AGT GCC AAG CTT GAT ATC G	54°C	Amplifikation der <i>spc</i> -Kassette aus pDG1726
3'spc1726	TTA CCG CGG TAT GAC CAT GAT TAC GCC AAG	63°C	
5'mls646	TAT ACT AGT GCC AAG CTT ATC GAA TTC	55°C	Amplifikation der <i>mls</i> -Kassette aus pDG646
3'mls646	TTA CCG CGG AGC TAT GAC CAT GAT TAC GC	63°C	
PMW1	TCG GAT ATC AAG CTT GGC ACT ACT ATA TGT ACG GAG GAT TAA ATA TTT TCC CAG AAG	69°C	Deletion von <i>yhfT</i> durch die <i>spc</i> -Kassette (Primer P3 der Fusions-PCR)
PMW2	GGC GTA ATC ATG GTC ATA CCG CGG TAA GTA TTG TCA TCC TCC TTT TGT AAA CAT CGT	71°C	Deletion von <i>yhfT</i> durch die <i>spc</i> -Kassette (Primer P2 der Fusions-PCR)

Tab. 3-3. Fortsetzung

Name	Sequenz 5' → 3'	T_m	Beschreibung
PMW3	GAC TTT AAG CCT GGC GAC GAGG	59°C	Deletion von <i>lcfA</i> durch die <i>mls</i> -Kassette (Primer P1 der Fusions-PCR)
PMW4	GGC GAT ACT ATG GTC ATA GCT CCG CGG TAA AAA ACC TCC CCT TTC GAT TTT AGA GAT CCT	73°C	Deletion von <i>lcfA</i> durch die <i>mls</i> -Kassette (Primer P2 der Fusions-PCR)
PMW5	GAA TTC GAT AAG CTT GGC ACT ACT ATA AAA AAG AGA ACG CCT ATG AAT AAA CTT GAC	67°C	Deletion von <i>lcfA</i> durch die <i>mls</i> -Kassette (Primer P3 der Fusions-PCR)
PMW6	ATA CCG AGA TTA AGC TCC GGG AGC	59°C	Deletion von <i>lcfA</i> durch die <i>mls</i> -Kassette (Primer P1 der Fusions-PCR)
PMW7	CAT GCA TGC TTA TCG AAT TCA ACG AGT ATA GTT TCT TGA CGA TAT TCC GAA AAA TGC GAC	69°C	Deletion von <i>yhfL</i> durch die <i>kan</i> -Kassette (Primer P3 der Fusions-PCR)
PMW8	GAG CTT GGC GTA ATC ATG CCG CGG TAA TCA TTG TTC CTC CTT TCT TAA TGA TAG GAA	71°C	Deletion von <i>yngl</i> durch die <i>tet</i> -Kassette (Primer P2 der Fusions-PCR)
PMW9	CGT TAT CGC CGG CTT TTC ACT ACT ATA ATC ATG TTT ACA AAA GTA CTG ATC GCC AAC	70°C	Deletion von <i>yngl</i> durch die <i>tet</i> -Kassette (Primer P3 der Fusions-PCR)
PMW10	TTC GAA CCT CAT TCG CAT GCC CG	59°C	Deletion von <i>yngl</i> durch die <i>tet</i> -Kassette (Primer P4 der Fusions-PCR)
PMW11	CCGTCT CTA CTG TTTCTG AGC TTG TGA AC	62°C	Deletion von <i>yhfT</i> durch die <i>spc</i> -Kassette (Primer P1 der Fusions-PCR)

Tab. 3-3. Fortsetzung

Name	Sequenz 5' → 3'	T_m	Beschreibung
PMW12	GAA CTT CAA ATA ATA AAG CCA GTC CAG TTC	58°C	Deletion von <i>yhfT</i> durch die <i>spc</i> -Kassette (Primer P4 der Fusions-PCR)
PMW13	GAG GAC TGC AAA ATC TTC GGA GAT TTC TTC	60°C	Deletion von <i>yhfL</i> durch die <i>kan</i> -Kassette (Primer P1 der Fusions-PCR)
PMW14	CGA GCT CGA ATT CGT AAT CAT GGT CAT ATC TCC CAC CCC TTA AGT GAA TGA ATA GTC A	71°C	Deletion von <i>yhfL</i> durch die <i>kan</i> -Kassette (Primer P2 der Fusions-PCR)
PMW15	GTT GTC TGT GTG GAA ATG TTA TAG TCA AGC	59°C	Deletion von <i>yhfL</i> durch die <i>kan</i> -Kassette (Primer P4 der Fusions-PCR)
PMW16	CTG GCG GTG ATA CGA TTT CAT ATG CCT TAG	62°C	Deletion von <i>yngI</i> durch die <i>tet</i> -Kassette (Primer P1 der Fusions-PCR)
YngI-5'	CAC CGC TGA ACT CAT CCA TTC C	57°C	Amplifikation von <i>yngI</i> für Expressionszwecke
YngI-3'	TTT ACT TGA TGA TAA GTT GAA CAT TTC AAT CGT	56°C	
YhfL-5'	CAC CAA TCT TGT TTC AAA ATT GGA AGA AAC	56°C	Amplifikation von <i>yhfL</i> für Expressionszwecke
YhfL-3'	TTT GGG CAA AAT ATC TCT CAG TGC CCG	58°C	
IcfA-5'- NcoI	TAT CCA TGG GAA AAA GAA AGA TTT ACC TTT CTT TTT C AAA GGA TCC TTT GAT ATG	59°C	Amplifikation von <i>lcfA</i> für Expressionszwecke
IcfA-3'- BamHI	ATG ATT TTC GGT TTC	58°C	

Tab. 3-3. Fortsetzung

Name	Sequenz 5' → 3'	T_m	Beschreibung
lipD-for	AAA AAA GAA TTC ATG TCA GAC CTC AGC ACC GC	62°C	Amplifikation von <i>lipD</i> für Expressionszwecke
lipD-rev	AAA AAA AGC TTT CAG GCG GAA CGC AGC TC	62°C	
dptA-for	TAT GGA TCC GAC ATG CAG TCG CAG CGC C	66°C	Amplifikation von <i>dptA-M1</i> für Expressionszwecke
dptA-rev	ATA GCG GCC GCC AGG AGC GGG AGA AGG CCG G	74°C	
dptE-for	CAC CAT GAG TGA GAG CCG CTG TGC CGG	67°C	Amplifikation von <i>dptE</i> für Expressionszwecke
dptE-rev	CGC GGG GTG CGG ATG TGG AG	63°C	
dptF-for	TAT GGA TCC AAC CCG CCC GAA GCG GTC	66°C	Amplifikation von <i>dptF</i> für Expressionszwecke
dptF-rev	ATA GCG GCC GCG GTG CGG TCG GCC AAC TG	70°C	

3.5 Vektoren

3.5.1 pQE60-Vektor

Der pQE60-Vektor (3431 bp) gehört zur Familie der pDS-Plasmide^[144] und basiert auf dem Plasmid pDS56/RBSII. Er besitzt einen T5-Promotor, zwei *lac*-Operatorerkennungssequenzen und eine synthetische ribosomale Bindungsstelle, die auf hohe Expressionsraten in *E. coli* optimiert wurde. Eine *in-frame* Ligation in die MCS, bestehend aus *Nco*I, *Bam*HI und *Bgl*II, führt zu einer C-terminalen Fusion der rekombinanten Proteine mit sechs Histidinen (His-tag). Die Sequenz ATG der *Nco*I Restriktionssequenz dient für die Expression als Startcodon. Ebenfalls durch die *Nco*I Restriktionssequenz wird ein Nukleotid des nachfolgenden Codons zu G

umgewandelt. Eine Klonierung in pQE60 mittels *Nco*I und *Bam*HI resultiert in einer Fusion der Aminosäurenreste GSRS, codiert durch die Erkennungssequenz von *Bam*HI und *Bgl*II, an den C-Terminus des Proteins vor dem His-tag. Das Plasmid verleiht Resistenz gegen Ampicillin durch Expression des β -Lactamasegens *bla* und wird repliziert in *E. coli* mittels ColE1 Replikationsursprungs aus pBR322.^[145] Die Genexpression im Plasmid pQE60 ist aufgrund der optimierten Promotorregion sehr effizient und kann nur in Gegenwart extrem hoher Lac-Repressorkonzentrationen vollständig unterdrückt werden. Zu diesem Zweck wurde der pRep4-Vektor verwendet.

3.5.2 pRep4-Vektor

Das Plasmid pRep4 (3740 bp, Qiagen) ist mit seinem Replikationsursprung P15A^{[146][147]} kompatibel zu ColE1-Plasmiden und kann so in Kombination mit pQE60-Vektoren gleichzeitig in *E. coli* verwendet werden. Es exprimiert den durch das *lacI*-Gen codierten Lac-Repressor.^[148] Durch das *neo*-Gen vermittelt es Resistenz gegen Kanamycin. Aufgrund einer Mutation in der RBS von *neo* sollten jedoch nur Konzentrationen von 25 μ g/mL zur Selektion eingesetzt werden.

3.5.3 pBluescriptII SK (+)-Vektor

Der pBluescriptII SK(+)-Vektor (pBS(+), 2,96 kb, Stratagene, Heidelberg) wurde mit der synthetisierten Gensequenz des ersten Moduls von Daptomycin (DptA-M1) von der Firma EZBiolabs bezogen. Bei diesem Vektor handelt es sich um ein pUC19-Derivat^[149] und trägt den ColE1-Replikationsursprung aus pBR322^[145], sowie das Ampicillin-Resistenz-vermittelnde β -Laktamase-Gen.

3.5.4 pGEX-4T-1-Vektor

Der pGEX-4T-1-Vektor (4970 bp, Amersham Bioscience) ermöglicht die Fusionierung einer Glutathion-S-Transferase an das Zielprotein und kann dadurch dessen Löslichkeit erhöhen. Dabei kann das GST-Protein durch eine vorhandene Thrombin-Erkennungssequenz direkt von der MCS mit selbiger Protease wieder abgespalten werden. Der Vektor trägt den pBR322-Replikationsursprung sowie den *tac*-Promotor

und Gensequenzen, die für den LacI-Repressor codieren. Das Plasmid verleiht Resistenz gegen Ampicillin durch Expression des β -Lactamase-Gen *bla*.

3.5.5 pDG-Vektoren

Die pDG-Vektoren stammen aus einer Plasmid-Kollektion, deren Konstrukte die unterschiedliche Antibiotika-Resistenzkassetten zur Klonierung und Selektion in *B. subtilis* tragen.^[150] Diese Resistenzkassetten werden in den Plasmiden von MCSs umgeben, welche eine einfache Isolation und Subklonierung dieser Gene ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Plasmide verwendet um die Resistenzkassetten via PCR zu amplifizieren und für die Fusions-PCR zu verwenden.

Das Plasmid pDG646 ist ein Derivat von pSB119^[151], welches eine Insertion der 1,6 kb-umfassenden Resistenz-Kassette *erm* aus dem *Staphylococcus aureus* Plasmid pE194 trägt.^[152] Dieses Plasmid diente zur Amplifikation der *mls*-Kassette, welche die Resistenz gegen die Antibiotika Erythromycin und Lincomycin vermittelt.

Das Plasmid pDG783, welches ein Derivat von pSB118^[151] darstellt, codiert die 1,49 kb-umfassende Kanamycin-Resistenz-vermittelnde Kassette *kan*, welches aus dem *Streptococcus faecalis* Plasmid pJH1 stammt.^[153]

Der pDG1514-Vektor trägt ein Tetrazyklin-Resistenz vermittelndes Gen (*tet*) mit einer Größe von 2,1 kb.

Der pDG1726-Vektor enthält ein Spectinomycin-Resistenz vermittelndes Gen (*spc*) mit einer Größe von 1,8 kb.

3.5.6 pBAD102/D-TOPO-Vektor

Das pBAD102/D-TOPO-Vektorsystem (Invitrogen) dient zur Klonierung und Expression rekombinanter Proteine mit C-terminalen His₆-tag. Mit diesem Tag kann das heterolog exprimierte Protein mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatografie isoliert werden. Zusätzlich wird ein N-terminales Thioredoxin-Protein (11,7 kDa) zur besseren Translationseffizienz und Löslichkeit fusioniert. Dieses Fusionsprotein kann durch eine Enterokinase-abgespalten werden. Die Expression wird über einen *araBAD*-Promotor reguliert und die Induktion ist mittels Arabinose möglich. AraC ist das Regulatorprotein des *araBAD* Promotors und ist ebenfalls auf dem Plasmid codiert.^[154] Ein C-terminales V5 Epitop ermöglicht zusätzlich die Proteindetektion mit

Anti-V5 Antikörpern.^[155] Der pUC Replikationsursprung sorgt für die low-copy Replikation in *E. coli*. Die Ligation des gewünschten Gen-Fragments erfolgt über die "TOPO Cloning Site". Die Selektion erfolgt über Ampicillin-Resistenz.

3.5.7 pQTEV-Vektor

Der pQTEV-Vektor ist ein Derivat des pQE60-Vektorsystems (Qiagen) und erlaubt die Einführung eines N-terminalen His₇-tags an das produzierte Protein. Nach der Reinigung des Zielproteins kann der His₇-Tag durch Inkubation mit der TEV-Protease abgespalten werden, da dieses Vektorsystem eine Erkennungssequenz in das rekombinante Protein einfügt. Der pQTEV-Vektor besitzt zwei *lac*-Operatorsequenzen in der Promotorregion. Das System selbst codiert für den Lac-Repressor und kann daher mit IPTG induziert werden. Zudem vermittelt das Plasmid Resistenz gegen Ampicillin durch Expression des β -Lactamasegens *bla* und wird in *E. coli* mittels ColE1 Replikationsursprungs aus pBR322 repliziert.^[156]

3.6 Mikroorganismen

Alle Klonierungen erfolgten im *E. coli* Stamm TOP10. Die Expression von Fusionsproteinen wurden in den *E. coli*-Stämmen BL21(DE3), M15 und ArcticExpress™ durchgeführt. Zur Expression von *holo*-ACP diente der *E. coli* Stamm HM0079.

Tab. 3-4. Verwendete und generierte Mikroorganismen

Stamm	Genotyp
<i>B. subtilis</i> MR168	<i>trpC2</i> ^[157]
<i>B. subtilis</i> JH642	<i>pheA1, trpC2, sfp</i> ^{0 [158]}
<i>B. subtilis</i> OKB105	Wildtyp-Stamm, Surfactin-Produzent OKB105 Surfactin-positiver Transformant von <i>B. subtilis</i> JH642, <i>pheA1 sfp</i> ^[159]
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332	Wildtyp-Stamm, Surfactin-Produzent ^[160]

Tab. 3-4. Fortsetzung

Stamm	Genotyp
<i>B. subtilis</i> MW1	OKB105 <i>yngl::tet</i> (diese Arbeit)
<i>B. subtilis</i> MW2	OKB105 <i>lcfA::mls</i> (diese Arbeit)
<i>B. subtilis</i> MW3	OKB105 <i>yhfT::spc</i> (diese Arbeit)
<i>B. subtilis</i> MW5	OKB105 <i>lcfA::mls yngl::tet</i> (diese Arbeit)
<i>B. subtilis</i> MW6	OKB105 <i>yngl::tet yhfT::spc</i> (diese Arbeit)
<i>B. subtilis</i> MW8	OKB105 <i>lcfA::mls yhfT::spc</i> (diese Arbeit)
<i>B. subtilis</i> MW11	OKB105 <i>lcfA::mls yhfT::spc yngl::tet</i> (diese Arbeit)
<i>E. coli</i> M15	<i>ara, gal, lac, mtl, nals, rifs, strs, F₁₆₁</i>
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>F⁻ ompT[lon]r_b⁻m_b⁻</i> (Stratagene)
<i>E. coli</i> TOP10	<i>F⁻ mcrA. (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZ.M15.lacX74 deoR recA1araD139.(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG (Invitrogen)</i>
<i>E. coli</i> ArcticExpress™	<i>B F⁻ ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal endA Hte [cpn10 cpn60 Gent^r] (Stratagen)</i>
<i>E. coli</i> HM0079	<i>E. coli-K12 nrdD::sfp-Sp^R [162]</i>

***Streptomyces roseosporus*:**

Streptomyces roseosporus NRRL 11379 wurde kultiviert, um chromosomale DNA zu gewinnen.

3.7 Kulturmedien

Für die Anzucht der *E. coli*-Stämme wurde das LB-Medium^[163] mit einem pH-Wert von 7,0 verwendet. Zur Proteinexpression wurde dem Medium 20 mM (Endkonzentration) Magnesiumchlorid zugefügt, um die Proteinlöslichkeit und -stabilität zu erhöhen.

LB-Medium: 10 g/L Bactotrypton; 5 g/L Hefeextrakt; 5 g/L NaCl

Die Autoinduktion erfolgte in einem speziellen Medium (s. Abschnitt 4.2.1.3 in den Methoden).

Als Sporulationsmedium für *B. subtilis* diente das DSM-Medium (Difco-Sporulations-Medium)^[159]

DSM-Medium: 8 g/L Nutrient Broth; 0,12 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g/L KCl; 600 μL NaOH (1 M)

Nach dem Autoklavieren wurde das Medium mit je 1 mL der folgenden Lösungen versetzt: 1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 0,1 M; MnCl_2 ; 1 mM FeSO_4

Medium 65

Streptomyces roseosporus wurde in Medium 65 mit einem pH-Wert von 7,2 kultiviert.

Medium 65: 4 g/L Glukose; 4 g/L Hefeextrakt; 2 g/L Calciumcarbonat; 10 g/L Malzextrakt

Zur Herstellung von Agarplatten wurden die Medien vor dem Autoklavieren mit 1,5 % (w/v) Agar Nr.1 versetzt. Zur Sterilisation wurden alle Lösungen und Medien vor dem Gebrauch 20 min bei 121 °C und 1,5 bar autoklaviert. Hitzeempfindliche Substanzen wie z. B. Antibiotika wurden den Medien als steril filtrierte Lösungen bei Temperaturen von ca. 50 °C zugesetzt.

3.8 Antibiotika

Antibiotika wurden nach Abkühlung auf 50°C in folgenden Konzentrationen steril zum Medium gegeben:

E. coli: Ampicillin 50 $\mu\text{g/mL}$, Kanamycin 25 $\mu\text{g/mL}$

B. subtilis: Kanamycin 10 µg/mL, Spectinomycin (in 50% EtOH) 25 µg/mL, Tetracyclin (in 50 % EtOH) 20 µg/mL, Lincomycin (in 50% EtOH) 2,5 µg/mL, Erythromycin (in EtOH p.a.) 0,25 µg/mL

3.9 Standardpuffer und Lösungen

Tab. 3-4. Standardpuffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
TE (Tris, EDTA)	10 mM Tris/HCl pH 8,1, 1 mM EDTA pH 8
EB	10 mM Tris/HCl pH 8,5
10 x PBS (englisch: phosphate buffered saline)	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
HEPES A	50 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 7,0
HEPES B	50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,0
Phosphat-Puffer A	50 mM NH ₂ PO ₄ , 100 mM NaCl, pH 7,0
Phosphat-Puffer B	50 mM NH ₂ PO ₄ , 100 mM NaCl, 250 Imidazol, pH 7,0

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Methoden wurden gemäß der etablierten und gängigen Vorschriften und Herstelleranweisungen durchgeführt.^[164] Abweichungen davon werden gesondert erwähnt.

4.1.1 Anzucht von *Streptomyces roseosporus*

Streptomyces roseosporus NRRL 11379 wurde zur Präparation der chromosomalen DNA wie folgt kultiviert. 5 mL des Flüssigmediums Medium 65 wurden nach dem Protokoll des Northern Regional Research Laboratory (NRRL, Peoria, IL, USA) mit lyophilisierten Sporen von *S. roseosporus* inokuliert und für 5-7 Tage bei 28°C und 250 Upm kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert (13000 Upm, 5 min, 4°C) und bei -20°C bis zur DNA-Entnahme gelagert.

4.1.2 Isolierung chromosomaler DNA

Zur Präparation der chromosomalen DNA von *Bacillus subtilis* und *Streptomyces roseosporus* wurde eine 25 mL Übernachtkultur (ü.N.) angesetzt und bei 37°C und 250 Upm inkubiert. Für die Präparation war eine Midi-Präparation vorgesehen. Die Zellkultur wurde durch Zentrifugation (4°C, 13000 Upm, 10 min) pelletiert und anschließend in 3,5 mL Puffer B1 resuspendiert. Die Suspension wurde mit 80 µL Lysozym (100 mg/mL) und 100 µL Proteinase K Lösung (20 mg/mL) versetzt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 1,5 mL Puffer B2 zugegeben und für 15 min bei 37°C inkubiert.

Das Lysat wurde mit 5 mL QBT-Puffer verdünnt und auf eine zuvor mit QBT-Puffer äquilibrierte Anionentauschersäule (Qiagen Tip 20) aufgetragen. Die gebundene DNA wurde zweimal mit je 7,5 mL QBT-Puffer gewaschen und anschließend mit 5 mL QF-Puffer eluiert. Anschließend wurde die DNA mit 0,7 fachen Volumen Isopropanol versetzt und durch Zentrifugation pelletiert (4°C, 13000 Upm). Das Pellet

wurde mit 70%igem EtOH p.a. gewaschen und in der Speedvac getrocknet. Die DNA wurde anschließend mit 1 mL EB-Puffer resuspendiert und bei 4°C gelagert.

B1-Puffer: 50 mM Tris, 50 mM EDTA, 0,5 % (v/v) Triton X-100, 0,5 % (v/v) Tween-20

B2-Puffer: 3 M Guanidiniumhydrochlorid, 20 % (v/v) Tween-20

QBT-Puffer: 750 mM NaCl, 50 mM Mops, pH 7,0, 15 % Ethanol, 0,15 % (v/v) Triton X-100

QC-Puffer: 1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15% Ethanol

QF-Puffer: 1,25 M NaCl, 50 mM MOPS pH 8,2, 15% Ethanol

4.1.3 DNA-Techniken

Folgende Standard-Techniken wurden nach Sambrook *et al.*^[164] durchgeführt. Die Plasmidpräparation aus *E. coli* erfolgte durch alkalische Lyse nach Birnboim *et al.*^[165]. Die Präparation chromosomaler DNA aus *B. subtilis* und *E. coli*, Reinigung von DNA mittels Anionentauschermatrix nach dem Prinzip von Vogelstein *et al.*^[166], Präparation und Verwendung elektrokompeter *E. coli* Zellen nach dem Verfahren von Southern.^[155]

4.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation einfacher DNA-Abschnitte

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifizierung von DNA-Sequenzen zur Vektorkonstruktion verwendet. Die PCR-Reaktionsansätze besaßen ein Gesamtvolumen von 50 µL. Für die Amplifizierung wurde die Phusion™-DNA-Polymerase der Firma New England Biolabs (Frankfurt a. M.) verwendet. Die Primer und die entsprechenden Hybridisierungstemperaturen sind der Tab. 3-3 (Material) zu entnehmen. Da teilweise in der vorliegenden Arbeit mit GC-reicher DNA gearbeitet wurde, wurde bei der Durchführung der PCR mit einem „hot start“ begonnen. Dies bedeutet, dass erst nachdem der Reaktionsmix eine Temperatur von 98°C hatte, die Primer zugegeben wurden.

PCR-Reaktionsansatz:

- 1-4 ng DNA-Matrize
- 0,5 µM 5'- bzw. 3'-Primer
- 10 µL 5x Phusion GC-Puffer
- 1 µL 10 µM dNTPs
- ad 50 µL ddH₂O

PCR-Program:

Tab. 4-1. PCR-Programm zur Vervielfältigung einfacher PCR-Fragmente

Temperatur	Dauer	Zyklen	Bemerkungen
98°C	2 min	1	Primer-Zugabe "hot-start"
98°C	30 s		
T _m + 3°C	15 s	25-35	
72°C	t _{frag}		
72°C	10 min	1	
4°C	∞		Lagerung

Die Bestimmung der Schmelztemperatur T_m war abhängig von der Länge und dem GC-Gehalt der eingesetzten Primer und erfolgte über folgende Formeln:

$$T_m = 2(wA + xT) + 4(yG + zC) \quad (4-1)$$

Bei Primern mit einer Länge von mehr als 13 Nukleotiden wurde folgende Formel zur Bestimmung der Schmelztemperatur T_m eingesetzt:

$$T_m = 64,9 + 41(yG + zC - 16,4)/(wA + xT + yG + zC) \quad (4-2)$$

w, x, y und Z sind die Anzahl der entsprechenden Basen A, T, G und C aus der gewählten Sequenz. Zu der ermittelten Schmelztemperatur wurden stets bei der PCR 3°C addiert.

Die Zeiten zur Amplifikation des DNA-Fragments t_{frag} ergaben sich aus den Eigenschaften der verwendeten Phusion™-Polymerase: 72°C / 30 s/kb.

4.1.5 Reinigung von PCR-Fragmenten

Die Reinigung der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte entweder über Agarose-Gelelektrophorese mit nachfolgender Gelextraktion (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen) oder aus dem PCR-Mix direkt (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen).

Bei dieser Methode wird die amplifizierte DNA durch die wasserentziehende Wirkung hoher Konzentrationen chaotroper Salze (ClO_4^- , GuHCl) auf einer Silicageloberfläche präzipitiert. Ethanolische Waschlösungen reinigen die DNA, bevor sie mit EB-Puffer rehydratisiert wird. Die Zusammensetzung der Puffer und auch die genaue Durchführung sind beim Hersteller angegeben. Der Elutionspuffer (EB-Puffer) wurde wie folgt angesetzt:

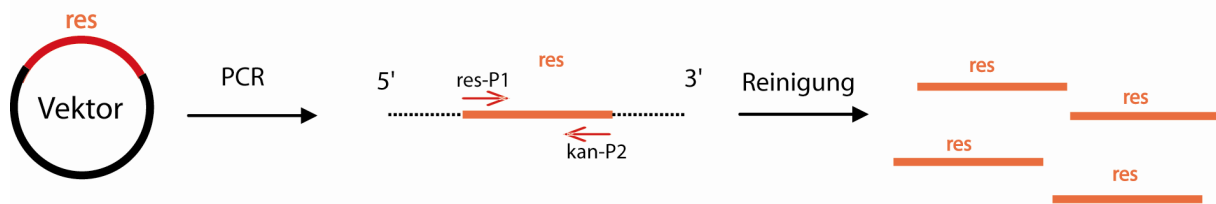
EB-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 8,5

4.1.6 PCR zur Herstellung von Deletionsmutanten

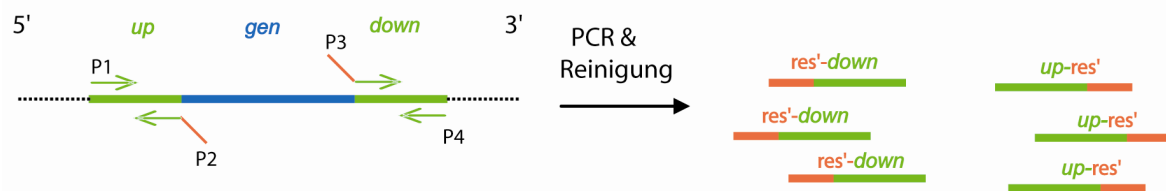
Diese Methode beruht auf der PCR-Generierung eines DNA-Fragments bestehend aus einem Resistenzgen umgeben von flankierenden Bereichen (ca. 1 kb) des zu deletierenden Gens. In Anlehnung an die von Kuwayama et al. beschriebene Methode^[167] wurden zunächst zwei ca. 1000 bp großen flankierenden Bereiche mit den Primern P1/P2 und P3/P4 aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* OKB105 amplifiziert. Zur Generierung der Oligonukleotide und der entsprechenden Resistenzkassette wurde die Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase verwendet.

Anschließend erfolgte die eigentliche Fusions-PCR. Hierzu wurden die PCR-Amplifikate der zuvor generierten stromaufwärts und stromabwärts gelegen Fragmente zusammen mit der ebenfalls zuvor amplifizierten Resistenzkassette als Matrize eingesetzt. Die Ausgangs-Amplifikate wurden vor dem Einsatz in die Fusions-PCR gereinigt. Mithilfe der Primer P1 und P4 wurde hauptsächlich nur das gewünschte Fusions-Fragment vervielfältigt, welches nach Reinigung zur Transformation der Bacillus-Stämme verwendet wurde.

1. Herstellung Resistenz-Kassette (res):



2. Herstellung up- und down-Fragmente:



3. Fusions-PCR:

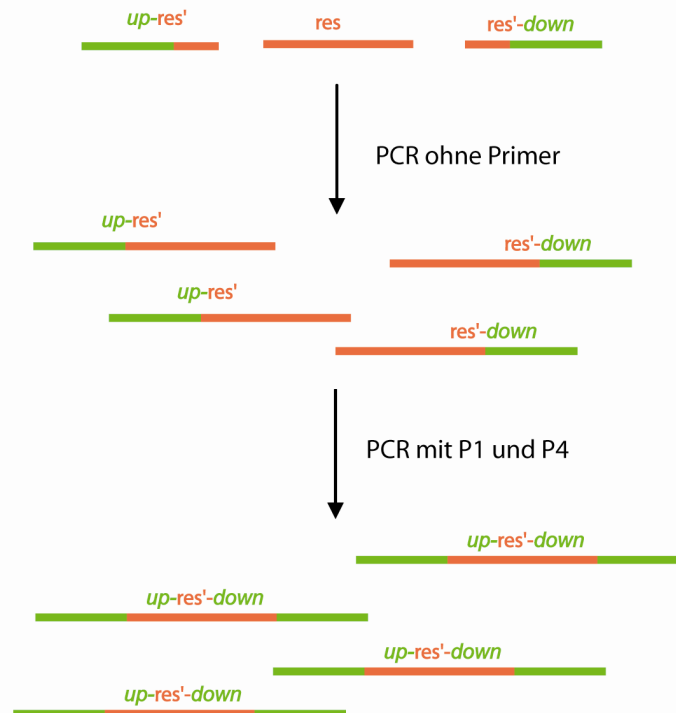


Abb. 4-1. Schema zur Darstellung einer Fusions-PCR für die Herstellung von *B. subtilis* Deletionsmutanten

Eine typische Fusions-PCR wurde wie folgt durchgeführt:

1 Zyklus	Denaturierung	98°C	120 s
10 Zyklen	Denaturierung	98°C	15 s
	Annealing	45°C	30 s
	Polymerisation	72°C	210 s

Pause: Während der letzten Denaturierungszeit wurden die Primer P1 und P4 zum PCR-Mix gegeben und wie folgt verfahren:

10 Zyklen	Denaturierung	98°C	15 s
	Hybridisierung	45°C	30 s
	Polymerisation	72°C	210 s
15 Zyklen	Denaturierung	98°C	15 s
	Hybridisierung	50°C	30 s
	Polymerisation	72°C	210 s
1 Zyklus	Polymerisation	72°C	300 s
	Aufbewahrung	4°C	∞

4.1.7 Colony-PCR

Zur schnellen Überprüfung der Deletions-Transformanten wurde direkt mit den Kolonien eine PCR-Analyse vorgenommen. Eine Kolonie wurde in 50 µL Lyse-Puffer resuspendiert und für 10 min bei 95°C lysiert. Anschließend wurde das Lysat für 10 min bei 13000 Upm zentrifugiert und vom Überstand wurden 4 µL für eine PCR verwendet.

Lyse-Puffer: 1% Triton X-100; 20 mM Tris-Cl pH 8.0; 2 mM EDTA pH 8.0

4.1.8 Hydrolytische Spaltung von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsenzyme stammten von der Firma NEB. Die endonukleolytische Spaltung von DNA wurde unter den vom Hersteller angegebenen Puffer- und Temperaturbedingungen durchgeführt, wobei der entsprechende Restriktionspuffer des Herstellers verwendet wurde. Es wurden sowohl präparative als auch analytische Restriktionsansätze durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden für den analytischen Ansatz für 60 min und für den präparativen Ansatz für 240 min bei 37°C inkubiert. Bei speziellen Enzymen wurden die Inkubationstemperaturen laut Herstellerangaben geändert. Das Ergebnis der endonukleolytischen Spaltung wurde durch analytische Agarosegelelektrophorese überprüft. Weiter wurden zum Partialverdau (analytischer Ansatz) von DNA die Temperaturbedingungen, die Reaktionsdauer und die Enzymmenge suboptimal gewählt.

4.1.9 Gelelektrophoretische Trennung von DNA durch Agarosegele

Präparative und analytische Trennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch horizontale Elektrophorese in 1-2%igen Agarosegelen in TB-Puffer. Den Agarosegelen wurden 0,08 µg Ethidiumbromid zur abschließenden Visualisierung der DNA unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) zugesetzt.^[168] Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 20% (v/v) 6x DNA-Probenpuffer versetzt und bei einer Spannung von 200 V gelelektrophoretisch getrennt. Mithilfe einer Digitalkamera konnte das Ergebnis der Agarosegelelektrophorese fotografisch festgehalten werden. Als Größenstandard für lineare und doppelsträngige (ds) DNA wurde gleichzeitig mit den Proben eines DNA-Marker der Firma NEB oder Fermentas nach Herstellerangaben aufgetragen. Welcher DNA-Größenstandard eingesetzt wurde, ist den entsprechenden Abbildungen im Ergebnisteil zu entnehmen.

TB-Puffer: 10% (v/v) 10x TB-Puffer

10x TB-Puffer: 109 g/L Tris, 55,63 g/L B(OH)₃

6x DNA-Probenpuffer: 15% (w/v) Ficoll 400, 0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol

4.1.10 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus PCR-Ansätzen oder Restriktionsansätzen wurde die DNA durch ein niedrig schmelzendes Agarosegel (0,8%) aufgetrennt und die gewünschten Fragmente aus dem Gel mit Hilfe von UV-Licht ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA aus den Gelstücken mittels QIAquick Gel Extraction Kit von der Firma Qiagen/Hilden verwendet und nach den Herstellerangaben über eine Kieselgel-Matrix unter Hochsalzbedingungen extrahiert.

4.1.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von Oligonukleotiden und größeren DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren erfolgte über Nacht bei 18°C in einem Gesamtvolumen von 10-20 µL. Dabei wurde ein 3facher Überschuss DNA-Fragment zu 20-50 ng linearisierten Vektor in Gegenwart von T4-DNA-Ligase-Puffer und T4-DNA-Ligase (NEB) eingesetzt.^[164] Außerdem wurde ein Ligationsansatz ohne Fremd-DNA und Ligase mitgeführt, um die Vektor-Qualität beurteilen zu können.

4.1.12 Konstruktion der Expressionsplasmide

Die zur Konstruktion der Expressionsvektoren verwendeten Primer und deren Schmelztemperaturen sind der Tabelle 3-3 (Materialteil) zu entnehmen. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde durch DNA-Sequenzierung (GATC Biotech) überprüft.

4.1.12.1 Das Konstrukt pQE60-*acpK*

Das Konstrukt pQE60-*acpK* zur Expression von AcpK als His₆-Fusionsprotein wurde freundlicherweise von Hr. Prof. H. Mootz (Technische Universität Dortmund, Fachbereich Chemische Biologie, Deutschland) zu Verfügung gestellt. Das Konstrukt lag bereits in *E. coli* M15 Zellen transformiert mit dem Plasmid pRep4-*gsp* vor (HM404).^[169] Das Gen *gsp* codiert für die 4'-Ppan-Transferase Gsp des Gramicidin S-Biosynthesystems aus *B. brevis*.^[170] Die Integration von *gsp* in den Vektor

pRep4 (s. Abschnitt 5.5.2 im Material-Teil) ermöglicht die *in vivo* Modifikation zum aktiven *holo*-AcpK.

4.1.12.2 Konstruktion von pET28a(+)-*lipD*

Das Konstrukt pET28a(+)-*lipD* wurde freundlicherweise von Verena Helmetag (Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie, Deutschland) generiert. Das 291 bp große Gen *lipD* wurde aus der chromosomalen DNA von *A. friuliensis* mittels PCR und den Primern *lipD-for* und *lipD-rev* erhalten. Das Fragment wurde gereinigt und mittels den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII* hydrolytisch gespalten. Anschließend erfolgte die Ligation in den durch die gleichen Restriktionsendonukleasen linearisierten und gereinigten Vektor pET28a(+). Der Ligationsansatz wurde dialysiert (2 h, RT) und in elektrokompetente *E. coli* Zellen TOP10 transformiert. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf LB-Agar-Platten versetzt mit Kanamycin (50 µg/mL) ü.N. bei 37°C im Brutschrank. Aus den erhaltenen Klonen wurde die Plasmid-DNA extrahiert und mittels analytischen Verdau auf Integration von *lipD* hin untersucht.

4.1.12.3 Konstruktion von pBAD102/D-TOPO-*dptE*

Zur heterologen Expression von *dptE* wurde das 1795 bp Genfragment mittels PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pBAD102/D-TOPO[®] ligiert. Als Templat für die PCR diente dabei die chromosomale DNA isoliert aus *S. roseosporus* sp. NRRL 11379, als Primer wurden die Oligonukleotide *dptE-for* und *dptE-rev* verwendet. Die PCR wurde mit der Phusion[®]-DNA-Polymerase durchgeführt. Die Hybridisierungstemperatur betrug 62°C. Das resultierende Plasmid pBAD102/D-TOPO-*dptE* wurden anschließend in den *E. coli*-Stamm TOP10 transformiert und auf LB-Agarplatten versetzt mit Ampicillin (100 µg/mL) zur Selektionierung der positiven Transformanten überführt. Die Integration von *dptE* in den Vektor wurde durch einen analytischen Verdau, nach der Isolierung der entsprechenden Plasmide, überprüft.

4.1.12.4 Konstruktion von pQTev-*dptF*

Das 270 bp große Gen *dptF* wurde aus der chromosomalen DNA von *S. roseosporus* amplifiziert mit den Primerpaaren *dptF*-for und *dptF*-rev. Die PCR erfolgte mit der Phusion-Polymerase, dabei betrug die Hybridisierungs-Temperatur 62°C. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Not*I umgesetzt und in den ebenso behandelten pQTev-Vektor ligiert. Anschließend erfolgte die Transformation in *E. coli* TOP10 Zellen und die Selektionierung auf LB-Agarplatten mit 100 µg/mL Ampicillin. Aus den erhaltenen Klonen wurden die Plasmide isoliert und mittels Restriktionsanalyse auf die Integration des Inserts überprüft.

4.1.12.5 Konstruktion von pQTev-*dptA-M1*

Das von der Firma EZBiolabs synthetisierte Plasmid (pBSII-SK(+)-*dptA-M1*) wurde zur Vervielfältigung in *E. coli* Top10 transformiert. Nach Kultivierung der positiven Klone wurde eine Plasmidpräparation im größeren Maßstab durchgeführt (Medi-Präparation). Nach der Reinigung erfolgte eine präparative Umsetzung des Konstrukts mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Not*I. Anschließend erfolgte die Trennung der Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese. Das ca. 3,1 kb große Fragment wurde aus dem Agarosegel isoliert und gereinigt. Dieses Fragment wurde anschließend in den ebenfalls mit *Bam*HI und *Not*I linearisierten und gereinigten Vektor ligiert. Nach Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli* Top10 erfolgte die Selektion auf LB-Agarplatten mit 100 µg/mL Ampicillin. Aus den erhaltenen Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und mittels analytischer Restriktionsanalyse auf die Integration von *dptA-M1* überprüft.

4.1.12.6 Konstruktion von pGex-4T-1-*dptA-M1*

Die Klonierung in das GST-Fusionssystem pGex-4T-1 erfolgte, wie es bereits für das pQTev-System beschrieben wurde, über hydrolytische Spaltung und anschließende Ligation.

4.1.12.7 Konstruktion von pQE60-*lcfA*

Die Konstruktion des Vektors pQE60-*lcfA* erfolgte in Zusammenarbeit mit Svetlana Gez (Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie, Deutschland).

Das 1680 bp große Gen *lcfA* wurde aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* ATCC 21332 mittels PCR und den Primern *lcfA*-5'-*NcoI* und *lcfA*-3'-*BamHI* erhalten. Die PCR wurde mit der Phusion-DNA-Polymerase durchgeführt, dabei betrug die Hybridisierungs-Temperatur 62 °C. Das Fragment wurde gereinigt und mittels den Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *NcoI* hydrolytisch gespalten. Anschließend erfolgte die Ligation in den durch die gleichen Restriktionsendonukleasen linearisierten und gereinigten Vektor pQE60. Der Ligationsansatz wurde dialysiert (2 h, RT) und in elektrokompente *E. coli* Zellen TOP10 transformiert. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf LB-Agar-Platten versetzt mit Ampicillin (100 µg/mL) ü.N. bei 37°C im Brutschrank. Aus den erhaltenen Klonen wurde die Plasmid-DNA extrahiert und mittels analytischen Verdau auf Integration von *lcfA* hin untersucht.

4.1.12.8 Konstruktion von pBAD102-*yhfL* und pBAD102-*yngl*

Zur Klonierung der Gene *yhfL* und *yngl* aus *B. subtilis* wurde eine PCR mit der Phusion-Polymerase durchgeführt. Die Vervielfältigung des Gens *yhfL* fand mit den Primern 5'-*yhfL* und 3'-*yhfL* und einer Hybridisierungs-Temperatur von 54°C statt. Die Größe des Amplifikats betrug 1,5 kb. Das 1,7 kb große Gen *yngl* wurde mit den Primern 5'-*yngl* und 3'-*yngl* amplifiziert. Die Hybridisierungs-Temperatur beider Gene betrug 54°C. Als PCR-Templat diente die chromosomale DNA aus *B. subtilis* sp. ATCC 21332. Als Expressionsvektor wurde der Vektor pBAD102/D-TOPO (Invitrogen) gewählt. Hierbei übernimmt eine Topoisomerase an den geöffneten Enden des Vektors die Ligation. Benötigt wurde lediglich ein CACC-Sequenz-Überhang am 5'-Ende der amplifizierten Insertsequenz zur gerichteten Ligation. Das erhaltene Ligations-Produkt wurde in elektrokompente *E. coli* TOP10 Zellen transformiert und zur Selektion auf Ampicillin-haltigen (100 µg/mL) LB-Agarplatten ausplattiert. Einige der erhaltenen Kolonien wurden zur Plasmidisolierung gewählt und anschließend durch Kontrollverdau und Sequenzierung auf ihre Richtigkeit

überprüft. Die so erhaltenen Konstrukte pBAD102-*yhfL* und pBAD102-*yngI* wurde für Expressionszwecke weiter verwendet.

4.1.13 Herstellung elektrokompenter Bakterien

Für Klonierungszwecke wurde ausschließlich der *E.coli*-Stamm TOP10 verwendet. Für Expressionszwecke wurden die *E. coli* Stämme BL21, M15, HM0079^[169] und ArcticExpress™ (dieser Stamm lag schon als elektrokompenter Stamm vor) verwendet. Die Prozedur zur Herstellung der elektrokompenten Zellen war für alle Stämme gleich und richtete sich nach der Methode zur Darstellung von elektrokompenten Bakterien. Als Vorkultur zur Herstellung elektrokompenter Zellen diente eine ü.N.-Kultur von 2 mL des entsprechenden Stammes in LB-Medium. Aus dieser Kultur wurden 200 mL LB-Medium inokuliert und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37°C und 200 Upm kultiviert. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis wurde die Kultur bei 4°C sedimentiert (5000 Upm, 15 min). Das Pellet wurde in drei Wiederholungen mit 100 mL eiskaltem bidestilliertem Wasser und einmal mit 10 mL eiskalter, wässriger 10%iger Glycerol-Lösung gewaschen. Zum Schluss wurden die Zellen in 1 mL 10%iger Glycerol-Lösung aufgenommen, aliquotiert (à 40 µL) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung bis zur Verwendung erfolgte bei -80°C.

4.1.14 Transformation elektrokompenter Bakterien

Der Ligationsansatz wurde dialysiert und mit 50-200 µL elektrokompenter Bakterien versetzt und für 1 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in eine Küvette zur Elektroporation überführt und die Transformation erfolgte über einen Elektroporator der Firma BioRad. Nach der Elektroporation wurden die Bakterien mit 1 mL 37°C warmen LB-Medium versetzt und für 30-40 min bei 37°C und 300 Upm inkubiert. Anschließend wurde die Kultur zentrifugiert (2 min, 13 000 Upm) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in LB-Puffer resuspendiert und auf eine vorgewärmte LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und ü.N. bei 37°C bebrütet.

4.1.15 Transformation von *B. subtilis*

Die Transformation von *B. subtilis* erfolgt beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase. Zu diesem Zeitpunkt ist der Organismus bereit DNA aufzunehmen und diese mittels homologer Rekombination in sein Chromosom zu integrieren.^{[157][171]}

Für die Transformation der *B. subtilis*-Stämme OKB105 und der in dieser Arbeit generierten Mutanten wurde –mit leichten Modifikationen- die Methode nach Klein *et al.* verwendet.^[16] Zur Transformation wurden die Zellen über Nacht bei 37°C und 250 Upm in HS-Medium angezogen. Anschließend wurden 20 mL LS-Medium mit Zellen dieser Übernachtskultur im Verhältnis 1:100 inokuliert und bei 30°C und 100 Upm inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,55 erfolgte die Transformation der *B. subtilis* Zellen, wobei 1 mL Zellsuspension mit 10-50 ng gereinigter Fusions-DNA bei 37°C für 2 Stunden inkubiert wurden. Anschließend erfolgte die Selektion der Transformanten durch Ausplattieren der Kultur auf DSM-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen.

10x S-Base: 20 g/L (NH₄)₂SO₄; 140 g/L K₂HPO₄ x 3H₂O; 60 g/L KH₂PO₄; Natriumcitrat x H₂O; nach dem Autoklavieren mit 1 mL einer 1 M sterilen MgSO₄-Lösung versetzt

HS-Medium: 100 mL/L 10x S-Base; 10 mL/L 50 % (w/v) Glukose; 10 mL/L 10 % (w/v) Hefeextrakt; 10 mL 2% (w/v) Casaminoäuren; 100 mL/L 8 % (w/v) Arginin / 4% (w/v) Histidin; 10 mL/L 0,5 % (w/v) Tryptophan; 15 mL/L 0,3 % (w/v) Phenylalanin; bei 105°C autoklavieren oder sterilfiltrieren.

LS-Medium: 100 mL/L 10 x S-Base; 10 mL/L 50% (w/v) Glukose; 10 mL/L 10% (w/v) Hefeextrakt; 45 mL/L 2% (w/v) Casaminoäuren; 1 mL/L 0,5% (w/v) Tryptophan; 1,5 mL/L 0,3% (w/v) Phenylalanin; 1 mL/L 50 mM Spermin; 2,5 mL/L 1 M MgCl₂; direkt vor Gebrauch ansetzen und anschließend sterilfiltrieren.

4.1.16 Plasmidisolierung nach dem Mini-Maßstab

Die Standard-Methode zur Präparation von Plasmiden aus *E. coli* erfolgte über die Mini-Präparation mittels alkalischer Lyse der Bakterien nach einer modifizierten Methode^[165]. Hierzu wurden einzelne Bakterienkolonien mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen, in 3 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum

überführt und ü.N. bei 37 °C im Schüttler (250 Upm) kultiviert. Die Bakterien wurden anschließend sedimentiert (1 min 13000 Upm, 4°C) und das Zellpellet wurde mit 300 µL Puffer P1 resuspendiert und durch Mischen mit 300 µL Puffer P2 lysiert. Die klare viskose Lösung wurde mit 300 µL Puffer P3 neutralisiert und auf Eis inkubiert (10 min). Das Trennen der löslichen Komponente, indem sich die zu präparierenden Plasmide befanden, von den unlöslichen Zellrückständen erfolgte durch Zentrifugation (10 min; 13 000 Upm; RT). Der Überstand wurde in ein 1,5-mL-Reaktionsgefäß überführt, mit 680 µL kaltem Isopropanol versetzt und für weitere 30 min bei 4 °C und 13000 Upm erneut zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol vorsichtig gewaschen und im Heizblock oder in der Speed-Vac bei 37°C getrocknet. Der Rückstand wurde in 40 µL EB-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,5) bei 37°C im Heizblock gelöst. Die Qualität der isolierten Plasmide wurde mittels DNA-Agarosegelelektrophorese determiniert.

Puffer P1: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/mL RNaseA

Puffer P2: 200 mM NaOH; 1% (v/v) SDS

Puffer P3: 2,5 KAc

4.1.17 Plasmidisolierung nach dem Maxi-Maßstab

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA, die für Transformationen, PCR oder Sequenzierungen benötigt wurden, wurde eine Maxipräparation aus 400-500 mL Bakterienkultur mittels des *Plasmid Maxi Kits* der Firma *Qiagen* (Hilden) nach einer modifizierten Lyse mit Anionentauscherchromatografie durchgeführt. Anschließend wurde die DNA-Konzentration und Reinheit fotometrisch ermittelt. Die Qualität der Plasmid-DNA wurde zusätzlich noch mittels einer Agarosegelelektrophorese bestimmt.

4.2 Proteinchemische Methoden

Folgende Standard-Techniken wurden nach Sambrook *et al.* ^[164] durchgeführt: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli^[172], Coomassie Blau-Färbung von

SDS-Polyacrylamidgelen nach Bennett und Scott^[173] und Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford^[174].

4.2.1 Expression von Fusionsproteinen in Bakterien

Zur Herstellung von Proteinen wurden die entsprechenden Konstrukte in die prokaryontischen Expressionsstämme BL21, M15, M15-pRep4 und ArcticExpress™ mittels Elektroporation transformiert.

4.2.1.1 Expression unter der Kontrolle des *lac*-Promotors

Die entsprechenden Zielgene in den Vektoren pQE60, pQTEV, pGex-4T-1 und pET28a(+) befanden sich unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors und die Vektoren das *lacI*-Gen enthalten, konnte die Expression der Fusionsproteine mit IPTG induziert werden. Eine Ausnahme bildete das pQE60-System, daher wurde dieses System in den *E. coli*-Stamm M15-pRep4 transformiert, da sich das *lacI*-Gen auf dem pRep4-Vektor befand.

Zur Testexpression wurden transformierte Bakterienklone in einer Flüssigkultur (LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum-Zusatz) im Schüttler bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 kultiviert. Vor der IPTG-Induktion wurde zur Kontrolle 1 mL uninduzierte Bakterienkultur entnommen, zentrifugiert und das Pellet für einen späteren Einsatz bei 4°C gelagert. Die restliche Kultur wurde auf 1 mM IPTG eingestellt. Nach 1, 2 und 3 Stunden Induktionsdauer wurde jeweils 1 mL Kultur entnommen, zentrifugiert und bei 4°C aufbewahrt. Die pelletierten Bakterienproben wurden in 200 µL TE-Puffer resuspendiert. Zur Überprüfung der Testexpression wurde mit den Proben eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie Blau-Färbung durchgeführt.

4.2.1.2 Expression unter der Kontrolle des *ara*-Promotors

Die Testexpression für das pBAD102/D-TOPO-Vektorsystem erfolgte aufgrund des *ara*-Promotors mit Arabinose. Die Testexpression wurde in Analogie zu dem bereits

beschriebenen *lac*-Promotorsystem durchgeführt, allerdings erfolgte die Induktion nicht mit 1 mM IPTG, sondern mit 0,2% (w/v) Arabinose.

4.2.1.3 Expression mittels Autoinduktion

Die Autoinduktion diente dazu die Akkumulation hoher Konzentrationen von un- bzw. fehlgefaltetem His₇-DptA-M1-Protein zu verhindern. Zur Autoinduktion wurde ein Medium verwendet, das neben Laktose auch Glucose und Glycerin enthält. Zu Beginn des Wachstums, also nach Inokulation des Autoinduktionsmediums mit dem *E. coli* Stamm BL21-pQTEV-DptA-M1, reprimiert Glukose die Transkription des *lac*-Promotors. Da Glukose bevorzugt von *E. coli* als Kohlenstoffquelle metabolisiert wird, nimmt die Konzentration von Glukose im Kultivierungsmedium mit zunehmendem Wachstum stetig ab. Ist Glukose verbraucht, wird der Stoffwechsel auf Laktose umgestellt und die Induktion beginnt von selbst. Laktose ist weniger effizient im Vergleich zu IPTG als Induktor. Durch diese Vorgänge erfolgt die Expression des Zielproteins schleichend und Fehlfaltungen können damit unterdrückt werden.^[175]

5 L Autoinduktionsmedium (37°C, 100 µg/mL Ampicillin) wurden mit 500 mL einer ü.N. Kultur angeimpft und für 16 h bei 25°C und 250 Upm kultiviert. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (5000 Upm, 15 min, 4°C) und bis zur Reinigung mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatografie bei -20°C aufbewahrt.

Autoinduktionsmedium: 1% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 25 mM Na₂HPO₄; 25 mM KH₂PO₄; 25 mM (NH₄)₂(SO₄); 1 mM MgSO₄, 0,5% (v/v) Glycerin; 0,22% (w/v) Laktose·H₂O; 0,22% (w/v) Glukose·H₂O

4.2.1.4 Genexpression von *lcfA* und *acpK* mit dem pQE60-Vektorsystem

Die Genexpression der Gene oder Genfragmenten in pQE60-Vektoren erfolgten entweder in *E. coli* M15 mit dem Plasmid pRep4 (*lcfA*), oder dem Plasmid pRep4-*gsp* (*acpK*). Das Konstrukt pQE60-*acpK* wurde von Prof. Mootz (Fachbereich Chemische Biologie, TU Dortmund) generiert und in *E. coli* M15/pREP4-*gsp* transformiert. Die erhaltenen Klone wurden HM404 benannt.^[169] 3 L LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin und 25 µg/mL Kanamycin wurden mit 300 mL einer ü.N. Kultur des jeweiligen Expressionsstammes inokuliert und im Schüttler bei 37°C und 250 Upm kultiviert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7 wurde die Genexpression durch

Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,1 mM) induziert und für 3-4 Stunden unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen durch Zentrifugation (15 min, 5000 Upm, 4°C) pelletiert und nach Verwerfen des Überstandes in 15 mL HEPES A-Puffer (*lcfA*), oder 15 mL Phosphat-Puffer A resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.2.1.5 Genexpression in ArcticExpress™-Zellen

Das Konstrukt pGex-4T-1-*dptA-M1* wurden zur Expression in die elektrokompetenten *E. coli*-Zellen ArcticExpress™ transformiert. Die Expression wurde durchgeführt, indem 5 L Ampicillin-haltiges (100 µg/mL) LB-Medium (37°C) mit 500 mL einer ü.N.-Kultur des Produzentenklons inokuliert und bei 37°C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 kultiviert (250 Upm) wurde. Anschließend wurde die Temperatur in regelmäßigen Abständen auf 10°C reduziert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 erfolgte die Induktion mit IPTG (0,05 mM Endkonzentration). Die Bakterien wurden für 36 h bei 10°C weiter kultiviert und anschließend pelletiert (4°C, 5000 Upm). Das erhaltene Pellet wurde in Phosphat-Puffer A resuspendiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

4.2.2 Auftauen und Einfrieren von Bakterienzellen

Die bei -80 °C gelagerten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut und entweder ausplattiert, in eine Flüssigkultur übertragen oder für Elektroporationszwecke mit DNA versetzt. Zum Einfrieren von Bakterienzellen wurden diese von einer Flüssigkultur 1 mL mit 1 mL 40%igem Glycerol (aq.) versetzt, in eine Einfrierampulle pipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

4.2.3 Präparation von *E. coli* Rohzelleextrakten

E. coli Zellen wurden mithilfe der French-Press® aufgeschlossen. In ihr wird die Zellsuspension unter hohem Druck (10000 psi) durch eine winzige Öffnung geleitet, hinter der es zur plötzlichen Entspannung und damit zum Auftreten starker Scherkräfte kommt. Die Zellsuspension wurde drei Kompressions-

/Dekompressionszyklen unterzogen. Der Aufschluss erfolgte stets bei 4°C. Unlösliche Bestandteile wurden mittels Zentrifugation (4°C, 30 min, 16000 Upm) vom Lysat abgetrennt. Der Überstand wurde steril filtriert (0,45 µm) und für die Proteinreinigung eingesetzt.

4.2.4. Proteinreinigung durch Affinitätschromatografie

4.2.4.1 His-tag-Fusionsproteine

Die Reinigung von Proteinen welche über eine C- oder N-terminalen His-tag verfügten (alle in dieser Arbeit eingesetzten Vektorsysteme außer pGex-4T-1 fusionierten einen His-tag an das Zielprotein) erfolgte über die Affinitätschromatografie (IMAC-Methode). Als stationäre Phase diente Ni²⁺-Nitrilotriacetat (NTA), welches kovalent an eine Agarose-Säulenmatrix gebunden vorliegt (Qiagen). NTA kann vier der sechs Koordinationsstellen von Ni²⁺-Ionen besetzen und diese dadurch an der Säulenmatrix immobilisieren.^[176] Proteine mit chelatbildenden Seitengruppen wie Histidin können die freien Koordinationsstellen besetzen und binden dadurch an die Säule. Das Auftragen und die Reinigung des Zielproteins erfolgten mittels einer FPLC-Apparatur (Amersham Bioscience). Nach Äquilibration der Säule (Chelating-Säule HR 10/2 befüllt mit 1 mL Ni²⁺-NTA-Agarose; Amersham Bioscience) mit HEPES A-Puffer (Surfactin-Projekt) oder Phosphat-Puffer A (Daptomycin-Projekt) wurde der zuvor mit 0,45 µm filtrierte Rohzelleextrakt mit einer Flussrate von 0,75 mL/min aufgetragen. Anschließend erfolgte das Waschen der Säule mit 3% HEPES B oder Phosphat-Puffer B (1 mL/min Flussrate), um unspezifisch gebundene Proteine an die Säule zu eluieren, bis im Durchfluss keine Proteine detektiert wurden. Nach dem Waschen der Säule wurde bei einer Flussrate von 1 mL/min ein linearer Gradient über 50 min von Puffer A auf Puffer B angelegt. Die Elution des Proteins erfolgte dabei durch Imidazol, das ebenfalls an die Nickelmatrix bindet und das Fusionsprotein verdrängt. Die Bestimmung der Reinheit der proteinhaltigen Fraktionen, welche in 1,5 mL-Fraktionen gesammelt wurden, erfolgte mittels SDS-PAGE-Analyse. Anschließend wurden geeignete Fraktionen vereint und mittels Dialyse gegen Assay-Puffer HEPES A oder Phosphat-Puffer A (s. Tab. 3-5 im Materialteil) oder durch HiTrap™-Säulen (Amersham Bioscience) umgepuffert und von Imidazol befreit. Die Bestimmung der

Reinheit und Konzentration der Proteinlösung erfolgte mithilfe des Nanodrop-Messgerätes (PEQlab) durch Messung der Absorption bei 280 nm.^[177] Die Proteine wurden entweder bis zur Verwendung auf Eis gehalten oder zur längeren Lagerung mit 10 % (v/v) Glycerol versetzt und bei -80°C gelagert. Alle Schritte der Proteinreinigung an der FPLC wurden bei 4°C durchgeführt.

4.2.4.2 GST-tag-Fusionsproteine

Das GST-DptA-Fusionsprotein wurde für die Untersuchung der Initiationsreaktion von Daptomycin eingesetzt. Dafür musste das Fusionsprotein zunächst aus dem Bakteriengesamtzellextrakt affinitätsgereinigt werden. Die Affinitätsreinigung erfolgte über den GST-tag des Fusionsproteins mittels Glutathion-Sepharose.^[178] Das Bakterienpellet mit dem exprimierten GST-DptA-M1-Fusionsprotein einer 5 L Kultur wurde nach dem Auftauen auf Eis in 30 mL PBS-Puffer resuspendiert und mittels French-Press® aufgeschlossen. Die Separierung der unlöslichen Bakterienbestandteile von der löslichen Phase erfolgte durch Zentrifugation (4°C, 20 min, 17000 Upm im Sorvall SS34-Rotor). Der Überstand wurde mittels eines 0,45 µm Filters filtriert und auf eine mit PBS-Puffer äquilibrierte Glutathion-Sepharose-beads beladenen Säule (Amersham Bioscience) überführt. Die Säule wurde solange mit PBS gewaschen, bis im Durchfluss kein Protein detektierbar war. Abschließend wurde das Fusionsprotein mit 6 mL Elutionspuffer von der Säule eluiert und in 500 µL Fraktionen gesammelt, die durch SDS-PAGE und Coomassie Blau-Färbung analysiert wurden. Beurteilung der Qualität und Quantität der Proteine erfolgte durch Messung der Absorption bei 280 nm mittels Nanodrop®.^[177] Die Fraktionen, die das Fusionsprotein enthielten, wurden vereinigt, umgepuffert und bis zur Verwendung auf Eis gehalten oder zur längeren Lagerung mit 10 % (v/v) Glycerol versetzt und bei -80°C gelagert. Alle Schritte der Proteinreinigung wurden bei 4°C durchgeführt.

PBS-Puffer: 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl, pH 7,3

Elutionspuffer: 50 mM Tris-HCl; 10 mM reduziertes Glutathion; pH 8,0

4.2.5 Dialyse von Proteinlösungen mit Dialyseschlauch

Zur Verwendung in den Enzym-Assays wurde die Proteinlösung gegen Assay-Puffer dialysiert. Bei dem Assay-Puffer handelte es sich um HEPES A-Puffer oder

Phosphat-Puffer A. Zur Inaktivierung von Proteasen und zur Komplexierung von Schwermetallionen wurden die eingesetzten Dialyseschläuche (Roth) zuvor mit einer wässrigen 10 mM EDTA Lösung erhitzt und anschließend gründlich mit bidestilliertem Wasser gereinigt. Die Proteinlösung wurde gegen das 200-fache Volumen Assay-Puffer für 2 Stunden dialysiert. Der Assay-Puffer wurde gewechselt und anschließend erfolgte eine Dialyse über Nacht.

4.2.6 Dialyse von Proteinlösungen mit HiTrap™-Desalting-Säulen

Das Austauschen von Puffersystemen von Proteinlösungen nach Reinigung des Zielenzyms erfolgte teilweise auch durch HiTrap™-Desalting-Säulen (Amersham Bioscience) mittels einer FPLC-Apparatur (Amersham Bioscience) und nach Herstellerangaben.

4.2.7 Ankonzentration von Protein-Lösungen

Die Konzentration der Proteine nach Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatografie lagen im nanomolaren Bereich. Zur Erhöhung der Konzentration in den micro- oder millimolaren Bereich, wurden die Proteinlösungen durch Viva-Spin-Säulen (Roth) ankonzentriert. Die Viva-Spin-Säulen mit geeignetem Anschlussvolumen (MWCO, englisch: *molecular weight cut off*) wurden vor Benutzung mit Proteinlösung mit Assay-Puffer gespült (4°C, 4000 Upm, 10-20 min je nach MWCO). Anschließend wurde die Proteinlösung bis zur gewünschten Konzentration eingeeengt (4°C, 4000 Upm, 10-50 min je nach MWCO).

4.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Expressionsprodukte erfolgte mit Hilfe einer vertikalen PAGE unter denaturierenden Bedingungen.^[164] Die verwendete Apparatur wurde von der Firma BioRad bezogen und nach den Herstellerangaben eingesetzt. Denaturierende PAGE dient dazu, Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht zu trennen. Die Probenvorbereitung, Herstellung der Gele und Durchführung der Elektrophorese erfolgte nach der Methode von Laemmli.^[172]

Tab. 4-2. Zusammensetzung des 5%igen Sammelgels und der verschiedenen Trenngele

	Sammelgel	Trenngel			
Stammlösungen	4%	7,50%	10%	12,50%	17,50%
Acrylamid-Lösung	500 µL	1,5 mL	2 mL	2,5 mL	3,5 mL
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	x	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	750 µL	x	x	x	x
10% /w/v SDS-Lösung	30 µL	60 µL	60 µL	60 µL	60 µL
10% (w/v) APS-Lösung	15 µL	30 µL	30 µL	30 µL	30 µL
bidest. Wasser	1,7 mL	2,9 mL	2,4 mL	1,9 mL	0,9 mL
TEMED	3 µL	3 µL	3 µL	3 µL	3 µL

Das Herstellen der Gelplatten und der Zusammenbau der SDS-PAGE Apparatur der Firma BioRad (Mini-Protean 3 Electrophoresis System) erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers. Die prozentuale Konzentration an Acrylamid im Trenngel hing vom Molekulargewicht der zu trennenden Proteine ab (s. Tab. 4-2). Die Proteinproben wurden mit 1 Volumen 4x-SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min. bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden 2-20 µL Probenvolumen aufgetragen und bei einer konstanten Spannung von 150 V für 60-90 min. gelelektrophoretisch getrennt. Das Gel wurde zur Visualisierung der Proteine mittels Coomassie Blau gefärbt. Nach der Färbung wurde das Gel auf 3 MM Whatman-Papier getrocknet und eingescannt. Um im Protein-Gel den erhaltenen Banden ein Molekulargewicht zuordnen zu können, wurde parallel mit den Proben ein Protein-Größenstandard aufgetragen. Hierfür wurde der PageRuler™ (10-200 kDa, Fermentas) eingesetzt. Wurde ein anderer Protein-Marker verwendet, ist dies bei den entsprechenden Abbildungen im Ergebnisteil vermerkt.

Acrylamid-Lösung: 30% (v/v) Acrylamid; 0,8% (v/v) N-N'-Methylenbisacrylamid

Laemmli-Puffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 7 mM SDS

4x-SDS-Probenpuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 6,8; 8% (w/v) SDS; 40% (v/v) Glycerin, 20% (v/v) β-Mercaptoethanol; 5 mg/L Bromphenolblau

4.2.9 Coomassie Blau-Färbung von Polyacrylamidgelen

Zur Färbung der SDS-Polyacrylamidgele mit Coomassie Blau wurden die Gele für 10-15 min in der erwärmten Färbelösung inkubiert und nach kurzem Wässern mit

erhitztem bidest. Wasser für 1 h in Entfärber-Lösung gelegt.^[173] Anschließend konnten die gefärbten Gele auf dem Leuchttisch beurteilt werden. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei ca. 100 ng pro Bande.

Färbelösung: 500 mL Ethanol; 100 mL Essigsäure; 250 mg Coomassie-Brilliant Blau R-250; 150 mL dH₂O

Entfärber-Lösung: 200 mL Ethanol; 100 mL Essigsäure, 700 mL dH₂O

4.2.10 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte fotometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm.^[177] Die benötigten Extinktionskoeffizienten der jeweiligen Proteine wurden mithilfe des Computerprogramms Protean (DNASStar) berechnet (s. Tabelle 4.3)

Tab. 4-3. Extinktionskoeffizienten und molare Massen der in dieser Arbeit generierten und verwendeten Proteine

Protein (Vektorsystem)	berechneter Extinktionskoeffizient [M⁻¹/cm]	MW [kDa]
DptF (pQTev)	$15,3 \cdot 10^3$	13,5
DptE (pBAD102/D-TOPO)	$97,6 \cdot 10^3$	80,5
DptA-M1 (pQTev)	$70,1 \cdot 10^3$	113,2
DptA-M1 (pGex-4T-1)	$108,7 \cdot 10^3$	135,7
LipD (pET28a(+))	$14,1 \cdot 10^3$	11,1
AcpK (pQE60)	$1,4 \cdot 10^3$	10,6
LcfA (pQE60)	$75,2 \cdot 10^3$	67,7
YhfL (pBAD102/D-TOPO)	$47,8 \cdot 10^3$	73,6
Yngl (pBAD102/D-TOPO)	$74,8 \cdot 10^3$	78,5

4.3 Biochemische Methoden

4.3.1 ATP-PPI-Austauschreaktion

Ein bekannter Weg zur Selektivitätsbestimmung von A-Domänen ist die ATP-PPI-Austauschreaktion. Beim ersten Reaktionsschritt der Aminosäure-Aktivierung durch die A-Domäne kommt es zur Bildung eines Aminoadenylats unter ATP-Hydrolyse. Diese Reaktion ist reversibel, daher kann die Rückreaktion verfolgt werden, um die

Enzymaktivität zu bestimmen.^[179] Da es sich bei dem ersten Schritt der Fettsäureaktivierung durch Acyl-CoA-Synthetasen ebenfalls um eine Adenylierung handelt, wurde vermutet, dass auch in diesem Fall über die Enzymaktivität mittels ATP-PPi-Austauschreaktion Rückschlüsse gezogen werden können. Die Grundlage dieser Methode besteht darin, dass durch den reversiblen Adenylierungsschritt der A-Domänen radioaktiv markiertes [³²P]-Pyrophosphat während ([³²P]-PPi) der Rückreaktion in ATP eingebaut wird. Dieses radioaktiv markierte ATP kann von dem übrigen Reaktionsansatz durch Aktivkohle separiert und quantitativ vermessen werden. Die Adsorption von markiertem [³²P]-ATP an den Aktivkohle-Niederschlag steht somit in Abhängigkeit zur Menge des aktivierten Substrates.

In parallelen Ansätzen wurden Substrat und Enzym vorgelegt und mit Puffer auf 50 µL aufgefüllt (Mix I). In einem zweiten Ansatz wurden ATP, PPi, MgCl₂ und radioaktiv-markiertes [³²P]-PPi vermischt und mit Puffer auf 50 µL aufgefüllt (Mix II). Nach dem Vermischen beider Proben wurden diese für 15 min bei 37°C inkubiert, bevor durch Zugabe von 500 µL eiskalter Terminationslösung die Reaktion gestoppt wurde. Die Suspension wurde vortexiert, eine Minute auf Eis inkubiert und anschließend durch Zentrifugation (13000 Upm, 1 min, 4°C) sedimentiert. Nach zwei Wiederholungen dieses Waschschrittes wurde die pelletierte Aktivkohle in 500 µL H₂O aufgenommen und in ein mit 3,5 mL Szintillationsflüssigkeit gefülltes Polypropylenmessgefäß (Rotiszint Eco Plus, Roth) überführt und gevortext. Die Zählrate der Probe wurde mit einem Szintillationszähler (Packard) bestimmt. Als Puffersystem wurde HEPES A-Puffer verwendet.

Reaktionsansatz: 500 mM Fettsäure (Substrat); 1 mM Enzym; 1mM ATP; 10 mM MgCl₂; 0,015 µCi [³²P]-PPi Assay-Puffer pH 7,0 *ad.* 100 µL

Terminationslösung: 100 mM Natriumpyrophosphat; 560 mM Perchlorsäure; 1,2% (w/v) Aktivkohle (Norit A)

4.3.2 Fettsäure-Aktivierungssassy

Acyl-CoA-Synthetasen katalysieren die Aktivierung von Fettsäuren zu CoA-Thioestern unter Verbrauch von ATP. Um diese Reaktion zu überprüfen, wurde ein typischer Reaktionsansatz von 100 µL angesetzt. Dieser Ansatz bestand aus 1 mM Enzym, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 300 µM CoA und 500 µM Fettsäure in Phosphat-Puffer A (Daptomycin) oder HEPES A-Puffer (Surfactin). Zusätzlich wurde zu jedem

Reaktionsansatz 1% (Endkonzentration) DMSO zur Löslichkeitssteigerung der Fettsäure addiert. Nach Inkubation von 30 min bei 37°C wurde das Reaktionsgemisch mit 30 µL Ameisensäure gestoppt, zentrifugiert (5 min, 13000 Upm) und mittels RP-HPLC-ESI-MS (Agilent 1100 MSD) analysiert (s. Abschnitt 4.5.2).

4.3.3 Modifikation von ACPs und PCPs mit CoA oder CoA-Derivaten und Sfp

Apoproteine wurde für biochemische Untersuchungen zunächst in die aktive *holo*-Form überführt. Hierfür wurde die rekombinante 4'-Ppan-Transferase Sfp aus *B. subtilis*, eingesetzt.^{[180][181]} Für die Verwendung von CoA-Derivaten in Protein-Assays wurde die breite Substratspezifität von Sfp ausgenutzt, denn Sfp akzeptiert Aminoacyl-^[60], Peptidyl-^[103] sowie an der SH-Gruppe derivatisierte CoA-Analoga^[182] als Substrate.

Zur posttranslationalen Modifikation mit dem 4'-Ppan-Kofaktor -dem sogenannten Priming- wurden die ACPs oder PCPs (25 µM) mit 100 µM Coenzym A-Natriumsalz oder CoA-Derivat (Fluoresceinyl-CoA oder Trp-CoA) und 15 µM Sfp für 5 min bei 37°C inkubiert. Als Assay-Puffer diente entweder HEPES A oder Phosphat-Puffer A versetzt mit 10 mM MgCl₂.

4.3.4 Thioesterspaltung

Substrate gebunden an PCPs oder ACPs enthalten einen Thioester, der säurestabil aber basenlabil ist. Zur Untersuchung von ACP- bzw. PCP-Domäne gebundene Produkte wurde eine Thioesterspaltung mit einer anschließenden HPLC-Produktanalyse durchgeführt. Zur alkalischen Thioesterspaltung wurde zu einem 100 µL-Assayansatz 1 mL einer 10% (w/v) TCA-Lösung gegeben. Dadurch wurde der Assay gestoppt und die Proteine präzipitiert. Zur quantitativen Fällung wurde die Reaktionslösung für 15 min auf Eis inkubiert und der Niederschlag durch Zentrifugation präzipitiert (13000 Upm, 1 h, 4°C). Anschließend wurde das Pellet in zweifacher Wiederholung mit 750 µL eines Gemisches aus Diethylether und Ethanol im Verhältnis 3:1 gewaschen und pelletiert (13000 Upm, 10 min, 4°C). Ein letzter Waschschriff erfolgte mit 500 µL Diethylether. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet im Heizblock getrocknet (37°C, 15 min). Die

Thioesterspaltung erfolgte durch Zugabe von 100 μL einer 0,1 M KOH-Lösung bei 70°C im Heizschüttler (15 min, 600 Upm). Anschließend wurde dem Reaktionsgemisch 1 mL Methanol zugegeben, vortexiert und über Nacht bei -20°C gelagert. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugation (13000 Upm, 60 min, 4°C) von der löslichen Phase getrennt. Der Überstand wurde in einer SpeedVac (Eppendorf) bis zur Trockene eingengt und der Rückstand in 20 μL 5% Acetonitril aq. gelöst. Die Bestandteile wurden durch HPLC-MS analysiert.

4.3.5 Enzym-vermittelter Transfer von Fettsäuren auf *holo*-ACPs

Für diese Reaktion wurde *holo*-ACP verwendet, das entweder unmittelbar vor der Reaktion *in vitro* generiert wurde (s. Abschnitt 4.3.3), oder das *in vivo* durch HM0079-Zellen erhalten wurde (s. Abschnitt 3.6 im Materialteil).

Ein typischer 25 μL Reaktionsansatz bestand aus 50 μM *holo*-ACP, 250 μM Fettsäure, 10 mM MgCl_2 , 1 mM ATP, 1% (Endkonzentration) DMSO und 1 μM Enzym in Phosphat-Puffer A (Daptomycin) oder HEPES A-Puffer (Surfactin). Nach Inkubation von 30 min bei 37°C wurde die Reaktion mit 7,5 μL Ameisensäure gestoppt, zentrifugiert (5 min, 13000 Upm) und mittels Massenspektrometrie (LTQ-FT, Thermo Fisher Scientific, s. Abschnitt 4.5.3) analysiert.

4.3.6 Bestimmung der kinetischen Parameter der Lipidierung von DptF katalysiert durch DptE

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter für die Lipidierungsreaktion von *holo*-DptF durch DptE wurden die Reaktionen unter ACP-Sättigung und variierenden Fettsäure-Konzentrationen durchgeführt. Abhängig vom Substrat wurden die Reaktionszeiten zwischen 30 s und 4 min variiert. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 25 μL und bei 37°C durchgeführt. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt 10 mM MgCl_2 , 1 mM ATP, 1 mM DptE, 50 μM *holo*-DptF, 1% (Endkonzentration) DMSO und verschiedene Fettsäurekonzentrationen (10-250 μM). Die Reaktion wurde nach einem bestimmten Zeitintervall mit 7,5 μL Ameisensäure gestoppt und zentrifugiert (5 min, 13000 Upm). Die Bestimmung der Konvertierungsrate von *holo*-DptF in acyl-DptF erfolgte mittels Massenspektrometrie (LTQ-FT, Thermo Fisher Scientific, s. Abschnitt 4.5.3). Die Bestimmung der

kinetischen Parameter und deren Standardabweichungen erfolgten durch die Software SigmaPlot 8.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) über das Michaelis-Menten-Plot-Verfahren.

4.4 Chemische Synthesen

4.4.1 Synthese von Fluoresceinyl-CoA

Die Synthese von Fluoresceinyl-CoA erfolgte in Anlehnung an das von Le Clair^[182] beschriebene Verfahren. Der grundlegende Reaktionsschritt ist eine Michael-Addition von CoA mit einem Fluorescein-modifizierten Maleimids. Der Reaktionsmechanismus ist in folgender Abbildung dargestellt (s. Abb. 4-2).

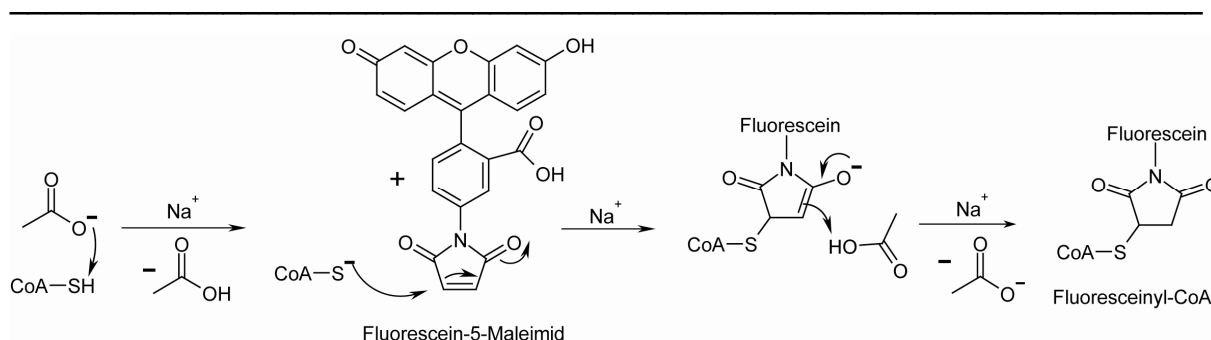


Abb. 4-2. Synthese von Fluoresceinyl-CoA mittels Michael-Addition

30 μmol Coenzym A wurden in 2 mL 50 mM MES/Acetat-Puffer (pH 6) vorgelegt. Langsam wurde eine Lösung von 25 μmol Fluoresceinyl-5-Maleimid (Pierce) gelöst in 300 μL Dimethylsulfoxid zur CoA-Lösung zugegeben und für 24 h bei RT und Dunkelheit gerührt. Die intensiv gelb gefärbte Lösung wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Die Identifizierung des CoA-Derivats erfolgte durch ESI-TOF-MS (berechnete Masse: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1195,2 g/mol, gemessene Masse: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1195,2 g/mol)

Reinigung mittels präparativer HPLC

Zur Isolierung der gewünschten Syntheseprodukte wurde das Rohprodukt mittels einer HPLC-Anlage (1100-System der Firma Agilent) über eine reversed-Phase-

Säule VP 250/21 Nucleodur 100-5 C18ec der Firma Macherey und Nagel gereinigt.
Folgender Gradient und Lösungsmittel wurden gewählt:

Flussrate: 20 mL/min

Laufmittel A: 0,1% TFA/H₂O (v/v)

Laufmittel B: 0.1 % TFA/Acetonitril (v/v)

Injektion: 5% Laufmittel B

Gradient:

5 min 5% Laufmittel B

20 min lineare Erhöhung von Laufmittel B auf 40 %

2 min lineare Erhöhung von Laufmittel B auf 95%

3 min stabil 95 % Laufmittel B

Äquilibration mit 5% Laufmittel B

Durch automatisierte Peakerkennung ($\lambda = 215 \text{ nm}$) wurden die Fraktionen gesammelt. Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereint und lyophilisiert.

4.4.2 Synthese von Tryptophan-CoA

Zur Synthese von Tryptophan-CoA (Trp-CoA) wurde als Ausgangssubstanz N^α-Boc-geschütztes Tryptophan verwendet. Der C-Terminus dieser Verbindung wurde durch PyBOP aktiviert, das wiederum von der deprotonierten Thiolgruppe des Coenzym As nukleophil angegriffen werden kann.^{[60][69]}

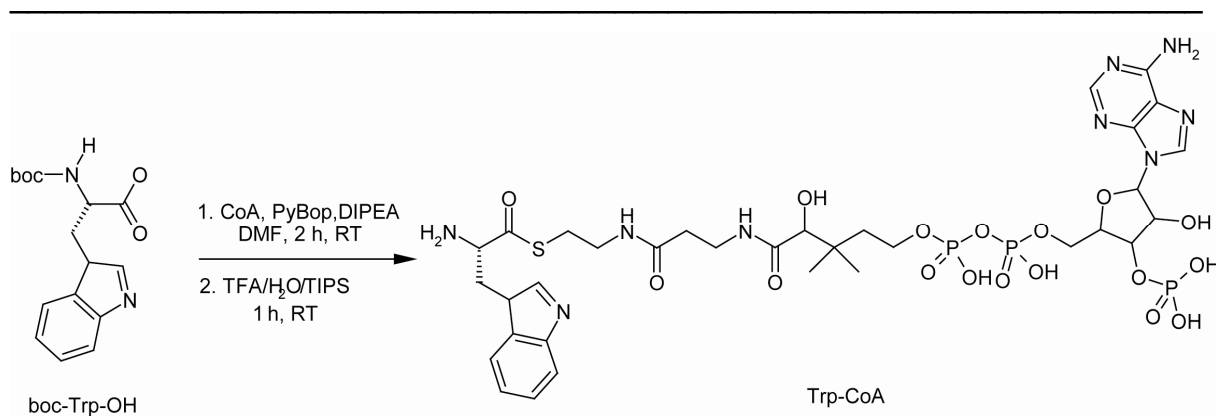


Abb. 4-3. Synthese von Tryptophan-CoA

1 eq. des geschützten Trp wurde mit 1 eq. CoA und 1,2 eq. PyBOP in DMF gelöst und für 5 min bei RT gerührt. Anschließend wurde die Base DIPEA zugegeben und das Reaktionsgemisch für 2 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde durch Gefriertrocknung entfernt, der Rückstand in einer Mischung aus TFA/ddH₂O/TIPS (95:2,5:2,5) gelöst und zur Abspaltung der Schutzgruppe für 1 h bei RT gerührt. Durch tropfenweise Zugabe von eiskaltem Diethylether wurde das Produkt gefällt. Um eine quantitative Ausbeute zu erhalten, wurde das Reaktionsgemisch über Nacht bei -20°C gelagert. Durch Zentrifugation (4000 Upm, 10 min, 4°C) wurde der Feststoff sedimentiert und der Überstand verworfen. Nach erneuter Gefriertrocknung wurde der Feststoff in 5% Acetonitril/Wasser gelöst und mittels präparativer HPLC gereinigt. Die Identifizierung des CoA-Derivats erfolgte durch Massenanalyse (berechnete Masse: [M+H]⁺ 967,2 g/mol, gemessene Masse: [M+H]⁺ 967,2 g/mol)

4.5 Analytische Methoden

4.5.1 Peptid-Massenfingerabdruck

Zur Identifizierung der in dieser Arbeit generierten Proteine wurde ein Peptid-Massenfingerabdruck durchgeführt. Hierzu wurden die Proteinproben nach SDS-PAGE und anschließender Coomassie Blau-Färbung aus dem Gel herausgeschnitten und mit 200 µL Entfärber inkubiert (30 min, 56°C). Nach Entfernen des Entfärbers erfolgte die Trocknung des Gel-Stücks in der SpeedVac (1 h, 30°C). Die Proteolyse des Proteins im getrockneten Gel erfolgte mittels Trypsin (*sequenzing grade trypsin*, 0,8 µg/µL Trypsin im Assaypuffer, Promega) bei 37°C über Nacht. Überschüssige Lösung wurde entfernt und das hydrolysierte Protein mit 10 µL Elutionspuffer aus dem Gel herausgelöst. Anschließend erfolgte die Analyse der Fragmente durch die Routineanalytik (Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg) mithilfe eines Nano-Spray-HPLC-QTOF-MS-Geräts und einer C18 PepMap-Säule (Macherey-Nagel). Die möglichen proteolytischen Spaltungsmuster der Probe und die theoretischen Massen wurden durch das Programm ExPASy-PeptideMass (www.expasy.org) ermittelt. Die Identifizierung der Proteine anhand der Peptidmassen aus den Massenspektren erfolgte unter Verwendung des Datenbanksuchprogramms Mascot (Matrix Science, London, UK).

Entfärber: 200 mM NH₄HCO₃ in 50% (v/v) Acetonitril

Elutionspuffer: 10% (v/v) Acetonitril versetzt mit 1% (v/v) TFA

4.5.2 Analyse mittels LCMS

Die Fettsäure-Assays wurden analysiert mittels High Performance Liquid Chromatografie (HPLC) kombiniert mit Elektronenspray-Ionisation (ESI) Massen Spektrometer (MS), Kurzform: LCMS (Agilent).

Bei der Methode handelte es sich um eine Reversed-Phase Chromatografie und eine C8 Säule wurde eingesetzt (125/2 Nucleodur 100-3 C8ec, 3 µM, Macherey-Nagel). Ein Standard-Volumen von 90 µL wurde injiziert. Eine Säulentemperatur von 30°C wurde eingestellt. Folgender Gradient und verwendete Laufmittel wurden gewählt:

Laufmittel A: Wasser/2 mM Triethylamin

Laufmittel B: 80% Acetonitril/20% Wasser/2 mM Triethylamin

Equilibrieren mit 5% Laufmittel B

Injektion: 5% Laufmittel B

Gradient:

10 min stabil 5% Laufmittel B

37 min lineare Erhöhung von Laufmittel B auf 95%

3 min stabil 95 % Laufmittel B

2 min lineare Erniedrigung von Laufmittel B auf 5%

8 min stabil 5% Laufmittel B

Die eluierten Substanzen wurden mittels UV bei 210 nm zeitabhängig detektiert und entsprechende Peaks wurden zu Massenidentifizierung (TIC) eingesetzt. Das Massenspektrometer wurde im negativen Modus eingestellt. Mit einer Flussrate von 0,3 mL/min besaßen die Edukte und Produkte eine Retentionszeit zwischen 22 und 35 min.

4.5.3 Analyse ACP-gebundener Substrate

Nach der Übertragung der Fettsäure-Komponente auf das ACP erfolgte dessen massenspektrometrische Analyse mittels LTQ-FT (Thermo Fischer Scientific) durch die Routineanalytik (Dr. Uwe Linne, Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg). Zum Entsalzen diente eine 8/2 Nucleodur C4 Vorsäule (Macherey und Nagel). Ein Standard-Volumen von 25 µL wurde injiziert. Die Säulentemperatur

betrug 40°C. Die Flussrate wurde auf 0,2 mL/min eingestellt. Folgender Gradient und Laufmittel wurden gewählt:

Laufmittel A: Wasser / 0,05% (v/v) Ameisensäure

Laufmittel B: Acetonitril / 0,045% (v/v) Ameisensäure

Equilibrieren mit 5% Laufmittel B

Injektion: 5% Laufmittel B

Gradient:

3 min stabil 5% Laufmittel B

15 min lineare Erhöhung von Laufmittel B auf 40%

2 min stabil 40% Laufmittel B

2 min lineare Erniedrigung von Laufmittel B auf 95%

6 min lineare Erniedrigung von Laufmittel B auf 5%

4.5.4 Surfactin-Präparation

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Präparation von Surfactin aus *B. subtilis* basiert auf dem Verfahren von Nakano.^[140] Hierbei wurden 20 mL vorgewärmtes SpIII-Medium in einem Verhältnis von 1:100 mit einer Übernachtskultur des entsprechenden *B. subtilis*-Stammes angeimpft und bis zur stationären Phase (OD₆₀₀ ca. 1,5) bei 37°C und 250 Upm inkubiert. Von der Kultur wurden je 2 mL entnommen und pelletiert. Der Überstand wurde insgesamt drei Mal mit je 500 µL n-Butanol als Extraktionsmittel versetzt und für 5 min bei RT und 300 Upm geschüttelt. Während der Extraktion wurden die n-Butanol-Proben bei 4°C aufbewahrt. Die organischen Phasen wurden vereint und anschließend in der Speedvac bei 45°C bis zur Trockene eingengt. Der erhaltene Rückstand wurde in 50 µL 70% (v/v) Methanol gelöst. Mittels HPLC-MS wurden die Proben auf Surfactin analysiert.

10x T-Base: 20 g/L (NH₄)₂SO₄; 183 g/L K₂HPO₄·3H₂O; 60 g/L KH₂PO₄; 10 g/L Natriumcitrat·2H₂O

SpIII-Medium: 100 mL/L 10x T-Base; 10 mL/L 50% (w/v) Glukose; 70 mL/L 1,2% (w/v) MgSO₄; 10 mL/L 10 % (w/v) Hefeextrakt; 5 mL/L 2% (w/v) Casaminosäuren
Vor Gebrauch frisch ansetzen und sterilfiltrieren.

4.5.5 Nachweis von Surfactin mittels Hämolyse

Das Lipopeptid-Antibiotikum Surfactin wirkt hämolytisch. Aus diesem Grund kann das Vorhandensein von Surfactin qualitativ mit Hilfe von Blutagar-Platten bestimmt werden. Die im Agar enthaltenen Erythrozyten von Schafsblut (5%) werden beim Vorhandensein von Surfactin lysiert und es entstehen gelblich-durchsichtige Zonen (Helos) an den entsprechenden Stellen auf den Platten. Der Nachweis von Surfactin-Produktion der *B. subtilis* Stämme erfolgte durch Ausstreichen der entsprechenden Kolonien auf Columbia-Blutagar-Platten (Beton Dickinson GmbH). Dabei wurden Bakterien-Kolonien verwendet die eine Nacht zuvor auf DSM-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert wurden. Die Inkubation der Stämme erfolgte bei 37°C für 18 h.

4.5.6 Surfactin-Analyse mittels HPLC/MS

Die quantitative Analyse des Surfactins der *B. subtilis*-Stämme aus den präparierten n-Butanol-Extrakten (s. Abschnitt 4.5.4) erfolgte anhand eines HPLC-MS-Verfahrens (110 MSD Series, Agilent, Waldbronn, Deutschland) unter der Verwendung einer Reversed-Phase-Säule (CC250/3 Nucleosil 120-3C8-Säule, Macherey und Nagel, Düren, Deutschland). Zur Analyse wurden standardmäßig 10 µL Probe auf die mit 70% Laufpuffer B äquilibrierte Säule injiziert. Eine Auftrennung der Proben konnte unter der Verwendung eines linearen Gradienten auf 100% Laufpuffer B innerhalb von 30 min mit einer Flussrate von 0,3 mL/min erreicht werden. Die Detektion der aufgetrennten Substanzen erfolgte unter der Verwendung eines UV-Detektors bei einer Wellenlänge von 214 nm sowie mittels eines Massen-Detektors im Positiven-Ionen-Modus über einen Massenbereich von 900 bis 1200 m/z.

Laufmittel A: 0,05% (v/v) Ameisensäure in H₂O

Laufmittel B: 0,045% (v/v) Ameisensäure in Methanol

5 Ergebnisse I: Untersuchungen zur Acylierung von Daptomycin

Das Bodenbakterium *S. roseosporus* sp. NRRL 11379 assembliert ein Gemisch aus zyklischen Lipopeptiden, den sogenannten A21978C-Faktoren und Daptomycin, einem seit 2005 in Deutschland zugelassenen Antibiotikum.^{[183][184]} Indiziert ist Daptomycin zur Behandlung von komplizierten Haut- und Weichteilinfektionen verursacht durch grampositive Bakterien.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Initiationsreaktion und die damit verbundene Lipidierung von Daptomycin untersucht werden. Ausgangspunkt für die in diesem Kapitel beschriebenen Arbeiten waren die Genomuntersuchungen von Miao *et al.*^[120] Durch Darstellung einer Cosmid-Genbank wurden zwei Gene *dptE* und *dptF* identifiziert, die aufgrund von Homologievergleichen möglicherweise an der Lipidierung von Daptomycin beteiligt sind. DptE weist einen hohen Grad sequenzieller Homologien zu Acyl-CoA-Synthetasen (FACS) auf.^[120] Dieses Protein wurde durch Immundetektion mit Antikörpern gegen das hoch konservierte A3-Kern-Motiv (SGTTGRPKG) von A-Domänen entdeckt. Dieses A3-Kern-Motiv ist in Adenylat-bildenden Enzymen weit verbreitet.^{[185][186]} DptF hingegen zeigt hohe Homologien zu CP-Proteinen und wurde als Acyl Carrier Protein deklariert. Die Lokalisation der Gene unmittelbar stromaufwärts der ersten Synthetase DptA, unterstützt zusätzlich die Hypothese.

5.1 Die putative Acyl-CoA-Synthetase DptE

FACS gehören zur Familie der Adenylat bildenden Enzyme, die die Aktivierung von Acylgruppen als Acyl-CoA katalysieren. Die Aktivierung von Fettsäuren durch FACS erfolgt durch einen Magnesiumionen-abhängigen Reaktionsmechanismus, mit Acyl-AMP als Zwischenprodukt. In einem ersten Schritt wird die Fettsäure, analog zu A-Domänen vermittelten Aminosäure-Aktivierung, als AMP-Derivat konvertiert. In einem zweiten Schritt findet die Übertragung der reaktiven Zwischenstufe auf die Thiofunktion des CoAs statt (Abb. 5-1).

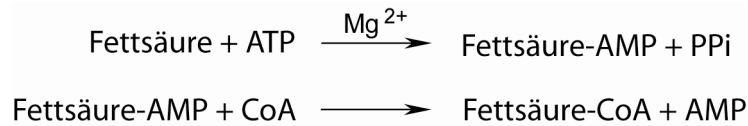


Abb. 5-1. Allgemeines Reaktionsschema für Acyl-CoA-Synthetasen. FACS katalysieren die Aktivierung von Fettsäuren zu CoA-Thioestern in einem Mechanismus bestehend aus zwei Reaktionen: In der ersten Reaktion wird das Fettsäure-AMP gebildet. In der zweiten Reaktion erfolgt die Bildung des Thioesters mit Coenzym A. Die Adenylierungsreaktion ist Mg^{2+} -abhängig.

Ein ähnlicher Mechanismus wird auch für DptE angenommen. Daher sollte im Folgenden die putative Acyl-CoA-Synthetase DptE genauer untersucht werden. Insbesondere sollten die beiden Reaktionsstufen während der Acyl-CoA Synthese mit verschiedenen Carbonsäuresubstraten charakterisiert werden. Dazu zählte die Adenylierungsreaktion sowie die anschließende CoA-Thioester Synthese. Um diese Aufgabenstellung zu begegnen, sollten die korrespondierenden Gene kloniert und die Proteine heterolog in *E. coli* exprimiert werden. Nach der Isolation der Zielproteine sollten diese biochemisch *in vitro* charakterisiert werden, um die mechanistischen Aspekte der Acylierungsreaktion und Substratspezifität untersuchen zu können.

5.2 Heterologe Expression und Isolation von DptE

Das Gen *dptE* wurde aus der chromosomalen DNA von *Streptomyces roseosporus* sp. NRRL 11379 amplifiziert und in den pBAD102/D-TOPO®-Vektor ligiert (s. Abschnitt 4.1.12.3 in den Methoden). Nach Transformation in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3) erfolgte die Reinigung des His₆-tag-Thioredoxin-Fusionsproteins (N-terminales Thioredoxin und C-terminales Hexahistidin) mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatografie. Das isolierte DptE-Fusionsprotein ergab ein lösliches Protein mit einer molekularen Masse von 80,5 kDa, dass mittels SDA-PAGE analysiert und durch Coomassie Blau-Färbung visualisiert wurde. Die Ausbeute pro Liter Fermentationskultur betrug 4,4 mg. Die Expression und Reinigung des Proteins ist in Abb. 5-2 dokumentiert.

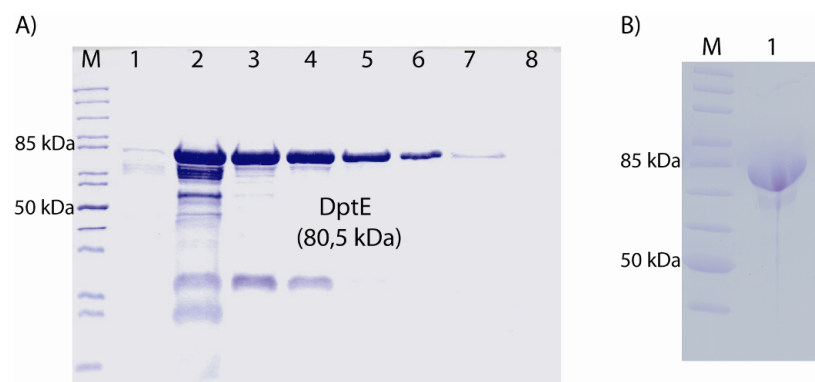


Abb. 5-2. Reinigung von DptE (FACS) nach Expression.

A: Coomassie Blau-Färbung. 2 μ L bakteriell exprimiertes und mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatografie gereinigtes DptE wurden mit einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Bahnen 1-8 zeigen die Elutionsfraktionen. Fraktionen 5-7 wurden weiterverwendet.

B: Coomassie Blau-Färbung. 0,5 μ L gereinigtes und konzentriertes DptE wurden mit einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt (Bahn 1). Diese Enzymlösung wurde für biochemische Untersuchungen verwendet. Bahn M: Proteinmarker (PageRuler) von der Firma Fermentas.

5.3 Bestimmung der Adenylierungsreaktion der FACS DptE

Das gereinigte DptE-Protein wurde auf die Fähigkeit hin untersucht, Dekansäure zu Dekanoyl-AMP zu aktivieren, mechanistisch analog zu den A-Domänen katalysierten Aminosäureaktivierung in NRPS-Systemen. Dabei wurde der ATP-PPi-Austausch als Untersuchungsmethode gewählt. Die Grundlage dieser Methode bildet die Spaltung (Hin-) bzw. die Entstehung (Rückreaktion) von radioaktiv markiertem ATP während der Adenylierungsreaktion. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte entsprechend den unter Methoden beschriebenen Verfahren (s. Abschnitt 4.3.1 in den Methoden). Zur Untersuchung der Adenylierungsreaktion wurden Enzymkonzentrationen zwischen 300 nM und 1 mM eingesetzt. Die ATP-Konzentration betrug 2 mM. Das Zeitfenster der Reaktion betrug 30 s und 1 min. Eine Aktivität von DptE konnte nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

5.3.1 Untersuchung der Adenylierungsreaktion in Abhängigkeit von CoA

Da DptE keine Aktivität im ATP-PPi-Austausch aufwies, wurde weiter untersucht, ob das Enzym für seine Aktivität CoA als Co-Substrat benötigt. Einige bereits charakterisierte Acyl-CoA-Synthetasen zeigen eine Aktivierung der Fettsäure als

CoA-Derivat.^{[45][187][188]} Da das Enzym DptE hohe Homologie zu FACS besitzt, und das CoA-Bindungsmotiv (FACS-Motiv) enthält (s. Abb. 8-3 im Anhang), wurde hier eine mögliche Thioesterifizierung mit CoA genauer untersucht. Zur Identifizierung des entstehenden Dekansäure-CoA-Produkts sowie der Reaktionsintermediate wurde ein HPLC-MS Assay entwickelt, der sich an den Bedingungen aus dem Surfactin-Projekt orientierte (s. Abschnitt 6). Eine Aktivierung der Fettsäure als CoA-Derivat durch DptE konnte in dieser Versuchsreihe nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

5.3.2 Aktivitätsüberprüfung von DptE mit dem ACP DptF

Ein alternativer Mechanismus besteht darin, dass DptE die Fettsäure als AMP aktiviert, und unmittelbar auf ein *holo*-ACP überträgt anstelle von CoA. Hierzu wurden die Arbeiten auf das transkriptionell gekoppelte DptF fokussiert. Es sollte untersucht werden, ob DptF im Komplex mit DptE agiert.

Fettsäure- und Polyketidsynthasen binden in Analogie zu Peptidsynthasen ihre Syntheseintermediate als Thioester über den enzymgebundenen Kofaktor 4'-Phosphopantethein. Dabei weisen die Acyl Carrier Proteine (ACPs) der Fettsäure- und Polyketidsynthasen Homologien zu den Peptidyl Carrier Proteinen (PCPs) auf. Insbesondere ist ein Sequenzmotiv GxDS(I/L), dass die 4'-Ppan-Bindungsstelle, den invarianten Serinrest enthält, unter allen Varianten hoch konserviert.^{[189][190]} Im Fall von DptF lautet dieses Motiv GLDSV₁. Damit ist DptF eines der wenigen ACPs bei dem Valin anstelle von Leucin oder Isoleucin im konservierten T-Motiv für CPs auftritt.

5.3.3 Heterologe Expression und Isolation von DptF

Für die Übertragungsstudien sollte das *holo*-ACP DptF eingesetzt werden. Die ACP-Domäne wurde aus der chromosomalen DNA von *S. roseosporus* amplifiziert (270 bp) und in den pQTEV-Vektor ligiert. Nach Transformation in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) erfolgte die Isolation des N-terminalen His₇-tag-Fusionsproteins durch Ni²⁺-Affinitätschromatografie. Das isolierte Protein (13,5 kDa) wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie Blau-Färbung

analysiert. DptF konnte als lösliches Protein erhalten werden (s. Abb. 5-3). Die Ausbeute betrug 9,5 mL/L Fermentationskultur.

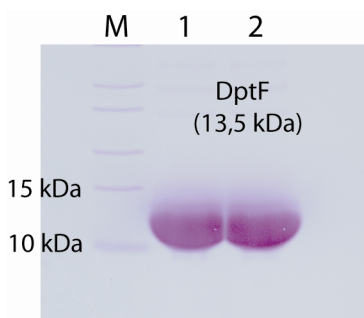


Abb. 5-3. Reinigung von DptF (ACP) nach Expression.

Coomassie Blau-Färbung. 0,1 μ L bakteriell exprimiertes, mit Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatografie gereinigtes und konzentriertes DptF wurden mit einem 17,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt (Bahnen 1 und 2). Diese Enzymlösung wurde für biochemische Untersuchungen verwendet. Bahn M: Proteinmarker (PageRuler) von der Firma Fermentas.

5.3.4 Modifizierung von DptF mit Sfp

CP-Domänen von Peptidsynthetasen und Fettsäure-Synthasen unterliegen einer posttranslationalen Modifikation durch 4'-Ppan-Transferasen, die *apo*-CPs in die katalytisch aktive *holo*-Form überführen.^[101] *E. coli* besitzt keine 4'-Ppan-Transferase, die in der Lage ist, DptF entsprechend zu modifizieren, sodass die heterologe Produktion von DptF nur zur katalytisch-inaktiven *apo*-Form führte. Zur *in vitro* Modifizierung von PCPs von NRPS-Systemen und ACPs von PKS-Systemen wird häufig Sfp aus *B. subtilis* verwendet, da dieses Enzym eine hohe Substrattoleranz besitzt.^{[102][103]} Da Sfp aber nicht ubiquitär CPs modifiziert, wurde zuerst untersucht ob dieses Enzym in der Lage ist DptF in die aktive *holo*-Form zu überführen. Hierfür wurde ein Ansatz mit Fluoresceinyl-CoA und Sfp gewählt. Anschließend wurde mit dem Reaktionsansatz eine SDS-PAGE durchgeführt. Vor dem Färben des Gels mit Coomassie Blau wurde das modifizierte DptF mittels UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$) visualisiert und erst im Anschluss eine Coomassie Blau-Färbung durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 5-4 dargestellt. Zur Kontrolle diente AcpK aus *B. subtilis*. AcpK wurde aus *E. coli* Zellen HM404 erhalten.^[169]

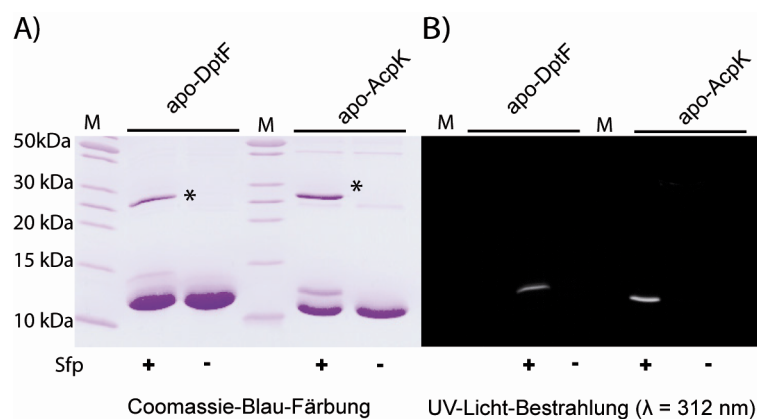


Abb. 5-4. Überprüfung der Modifikation von apo-DptF zur aktiven *holo*-Form mittels Sfp.

In vitro 4'-Phosphopantetheinylierung von apo-DptF und apo-AcpK (Kontroll-Protein) durch die 4'-Ppan-Transferase Sfp aus *B. subtilis*. Reaktionsgemische mit dem entsprechenden ACP wurden jeweils mit Sfp (+) und ohne Sfp (-) inkubiert und anschließend durch SDS-PAGE (17,5 %iges SDS-Gel) getrennt. A: Nach UV-Licht-Bestrahlung Coomassie Blau gefärbtes SDS-Gel zur Visualisierung aller eingesetzten Proteine. B: UV-Licht-Bestrahlung bei $\lambda = 312$ nm des ungefärbten SDS-Gels zur Überprüfung der Beladung des ACPs mit Fluoresceinyl-CoA durch Sfp. (* Sfp). Bahn M: Proteinmarker (PageRuler) von der Firma Fermentas.

In Abb. 5-4 ist deutlich zu erkennen, dass es möglich war, mit der 4'-Ppan-Transferase Sfp aus *B. subtilis* apo-DptF in die aktive *holo*-Form zu konvertieren. Damit wurde eine Grundlage geschaffen, DptF für weitere biochemische Untersuchungen, bezüglich der Übertragung von Dekansäure durch die DptE katalysierte Reaktion, einzusetzen.

5.3.5 Koexpression des ACPs DptF mit Sfp und Aktivitätsstudien mit DptE

Zur Aktivitätsüberprüfung von DptE mit DptF musste das ACP in der aktiven *holo*-Form vorliegen. Um eine quantitative posttranslationale Modifikation des ACPs zu erhalten, wurde versucht die Umwandlung *in vivo* zu erreichen. Dazu lag ein *E. coli*-Stamm (HM0079) vor, der die codierende Sequenz von Sfp unter der Kontrolle eines *lac*-Promotors im *nrdD*-Locus von *E. coli* enthielt. Das *nrdD*-Operon codiert für eine Ribonukleotid Reduktase, die unter aeroben Wachstumsbedingungen bei Raumtemperatur nicht essenziell ist.^{[191][162]} HM0079 wurde von Herrn Prof. Dr. H. Mootz (Universität Dortmund) konstruiert und zur Verfügung gestellt. Dieser Stamm ermöglicht die heterologe Expression von Sfp durch Induktion mit IPTG. Somit können ACPs und PCPs während der Produktion in *E. coli in vivo* in die aktive *holo*-

Form überführt werden. Das Konstrukt pQTev-*dptF* wurde in diesen Stamm transformiert. Die Expression und Reinigung von DptF erfolgte nach dem gleichen Verfahren, wie es bereits für die Expression in *E. coli* BL21 beschrieben wurde. Das Ergebnis der *in vivo* Modifizierung wurde mittels FTMS-Analyse überprüft (Abb. 5-5 A und B). Da sehr gute Thiolierungsraten (nahezu 100% *holo*-DptF) mit dieser Methode erzielt werden konnten, wurde fortan nur die *in vivo* Co-Expressionsmethode mit Sfp gewählt, da sie eine Nachmodifikation der heterolog exprimierten Enzyme substituierte.

Das so erhaltene *holo*-DptF wurde auf die Aktivität mit DptE hin überprüft. Dazu wurden 50 μ M DptF, 500 μ M Dekansäure, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP und 1 μ M DptE inkubiert. Nach 10 min Reaktionszeit wurde der Assay mit 10 % Ameisensäure gestoppt und mittels HPLC-ESI-MS verifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.5 dargestellt.

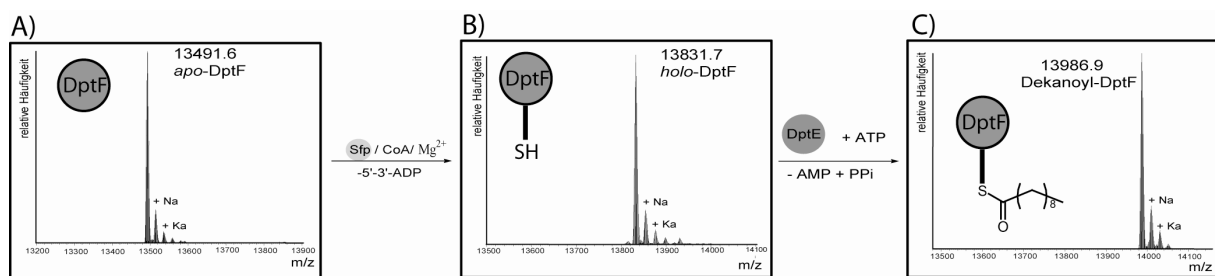


Abb. 5-5. FT-MS-Analysen von apo-DptF und anschließender Konvertierung zu holo-DptF und Beladung mit Dekansäure durch DptE

A: FT-MS-Spektrum des in *E. coli* BL21 heterolog exprimierten apo-DptF-Proteins.

B: FT-MS-Spektrum des in HM0079 heterolog exprimierten holo-DptF-Proteins.

C: FT-MS-Spektrum des ACPs nach Beladung mit Dekansäure durch DptE.

Im ersten Spektrum (s. Abb. 5.5 A) ist das aus *E. coli* BL21 stammende apo-DptF ($[M+H]^+ = 13491,6$ m/z gemessen; $[M+H]^+ = 13491,9$ m/z berechnet) zu erkennen. Im zweiten Spektrum (B) ist das in HM0079 heterolog exprimierte holo-DptF ($[M+H]^+ = 13831,7$ m/z gemessen; $[M+H]^+ = 13491,9$ m/z berechnet) wiedergegeben. Deutlich zu erkennen ist, dass kein weiteres apo-DptF detektierbar war. Im dritten Spektrum (C) ist die Beladung des holo-DptFs mit Dekansäure durch DptE dargestellt. Dekanoyl-DptF ($[M+H]^+ = 13986,9$ m/z gemessen; $[M+H]^+ = 13986,9$ m/z berechnet). Auch hier ist kein Edukt (holo-DptF) detektierbar.

Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass eine Koinkubation des ACPs DptF mit DptE und der in Daptomycin vorkommenden Dekansäure, in der Beladung von DptF resultierte.

5.4 Nachweis der Fettsäure-Aktivierung als Adenylat

Um den postulierten zweistufig verlaufenden Fettsäure-Aktivierungs-Mechanismus (s. Abb. 5-1) nachweisen zu können, wurde der in Abschnitt 5.3.5 beschriebene Reaktionsablauf wiederholt. In diesem Ansatz wurde jedoch *apo*-DptF anstelle von *holo*-DptF eingesetzt, um so eine detektierbare Akkumulierung von Dekansäure-Adenylat zu erreichen. Diese Reaktion wurde ebenfalls nach 10 min mit 10% Ameisensäure gestoppt und mithilfe einer LC-MS-Messung quantifiziert. Ein AMP-Zwischenprodukt konnte jedoch auch mit dieser Methode nicht detektiert werden.

Ein weiterer Ansatzpunkt war, den ATP-PPi-Austausch zu wiederholen und zusätzlich *apo*-DptF in der Reaktion einzusetzen. Vermutet wurde, dass DptE für seine Aktivität sowohl ATP, Dekansäure und DptF als Substrate benötigte. Als Kontrollreaktionen wurden jeweils die Reaktionskomponenten radioaktives PPi (hot-PPi), DptE, *apo*-DptF, Magnesiumchlorid oder ATP durch Puffer ersetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5-6 zusammengefasst.

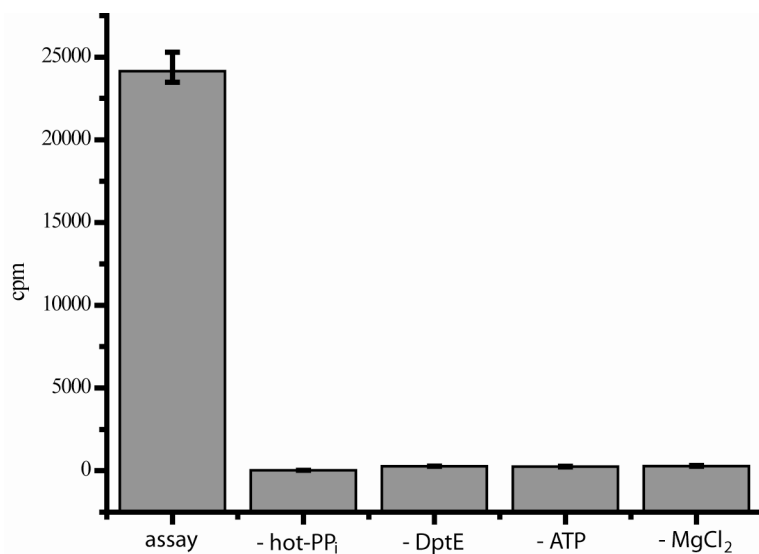


Abb. 5-6. Nachweis der Adenylatbildenden Stufe von DptE

ATP-PPi-Austauschreaktion von DptE in Gegenwart von *apo*-DptF (Assay). Kontrollreaktionen wurden jeweils ohne radioaktiv-markiertem PPi (hot-PPi), DptE, ATP oder Magnesiumchlorid durchgeführt.

In Gegenwart von *apo*-DptF ist eine 100-fach höhere Aktivität, im Vergleich zu den Kontrollreaktionen jeweils ohne radioaktiv-markiertem PPi, DptE, ATP oder Magnesiumchlorid, zu verzeichnen. Mit dieser ATP-PPi-Austauschreaktion konnte nachgewiesen werden, dass sich Dekanoyl-AMP als Zwischenprodukt bildet (Abb. 5-6 Assay).

5.5 Kinetische Untersuchungen zur Bestimmung der Substratspezifität von DptE und DptF

5.5.1 Kinetische Untersuchung der Acylierung von DptF durch DptE

Nachdem gezeigt werden konnte, dass DptE in der Lage ist, DptF mit Dekansäure zu modifizieren, stellte sich nun die Frage nach der Spezifität von DptE gegenüber DptF. Im Folgenden sollten die kinetischen Konstanten K_M und k_{cat} für DptF als Substrat bestimmt werden.

Die Anfangsgeschwindigkeit, mit der eine enzymatische Reaktion abläuft, ist abhängig von der Konzentration des Substrates (Fettsäure oder ACP). Die Michaelis-Menten-Konstante ist die Substratkonzentration, bei der eine Enzym-katalysierte Reaktion mit der Hälfte seiner Maximalgeschwindigkeit abläuft. Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten wurde die in Abschnitt 5.3.5 beschriebene Methode verwendet. Für jede Substratkonzentration wurden mindestens drei Messungen durchgeführt. Die Ausgangssubstanzen DptE, $MgCl_2$ und ATP wurden konstant gehalten. Die Kinetikbestimmung erfolgte unter gesättigten Dekansäure-Bedingungen von 500 μM . Die Konzentration von *holo*-DptF hingegen wurde zwischen 2,5 und 250 μM variiert. Wie in den Methoden (4.3.6) beschrieben wurde die enzymatische Reaktion in 50 mM Phosphatpuffer A (pH 7,0) bei 37°C und in einem Gesamtvolumen von 25 μL durchgeführt. Die kinetischen Konstanten wurden mit der Michaelis-Menten-Gleichung und dem Programm Sigma Plot 8.0 ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5-7 und 5-8 zusammengefasst. Die katalytischen Konstanten betrugen 29,4 μM (K_M) und 7,4 min^{-1} (k_{cat}), daraus ergibt sich eine katalytische Effizienz von 0,25 $min^{-1} \mu M^{-1}$.

Um zu überprüfen, ob Coenzym A einen Einfluss auf die Reaktion hat, wurde der Ansatz wiederholt. CoA (10 mM) wurde zur Reaktion addiert. Einen Einfluss auf den Mechanismus konnte nicht festgestellt werden. Die zuvor ohne CoA ermittelten kinetischen Konstanten blieben unverändert. Somit konnte gezeigt werden, dass DptF das kognate Substrat von DptE darstellt.

5.5.2 Kinetische Untersuchung der Fettsäure-Substratspezifität von DptE

Bekannt ist, dass eine Zugabe von Dekansäure zum Kultivierungsmedium einen Einfluss auf die Assemblierung der A21978C-Faktoren ausübt, da Daptomycin

dadurch als Hauptprodukt assembliert wird.^[192] Um die Präferenz von DptE für die Dekansäure gegenüber anderen Fettsäuren kinetisch zu untersuchen, wurde der bereits beschriebene Ansatz (s. Abschnitt 5.5.1) wiederholt und weiter modifiziert. Hierbei wurde DptF mit einer konstanten Konzentration von 50 μM eingesetzt. Die Konzentration der Dekansäure wurde zwischen 2,5 und 500 μM variiert. Es konnten folgende kinetischen Parameter ermittelt werden: $K_M = 8,2 \mu\text{M}$ und $k_{\text{cat}} = 3,4$, daraus ergibt sich eine katalytische Effizienz von $0,42 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ (Abb. 5-7).

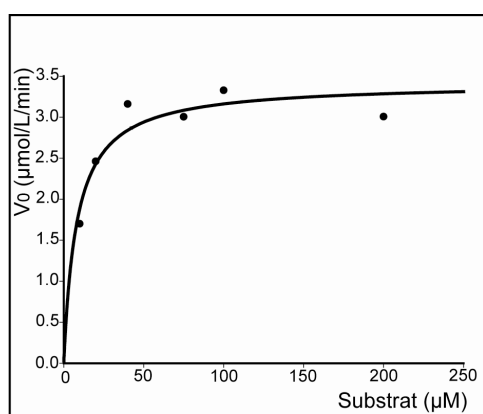


Abb. 5-7. Michaelis-Menten Diagramm am Beispiel der Umsetzung von Dekansäure durch DptE
Michaelis-Menten-Kinetik unter Sättigung von *holo*-DptF und ATP. Ermittelte Werte: K_M ($8,2 \mu\text{M}$), k_{cat} ($3,4 \text{ min}^{-1}$) und einer katalytischen Effizienz von $0,42 \text{ min}^{-1}/\mu\text{M}$.

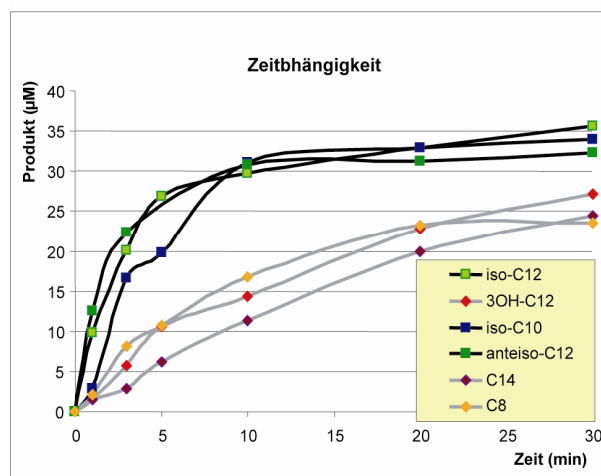
Nach dem gezeigt werden konnte, dass DptE in der Lage ist, DptF mit Dekansäure zu beladen wurde die Substratspezifität von DptE untersucht. Dazu wurden Fettsäuren verschiedener Kettenlängen (C6-C16) eingesetzt, die entweder linear, verzweigt (iso- und anteiso-Formen) oder einfach ungesättigt waren. Zusätzlich wurde eine weitere β -Hydroxy-dodekansäure (3OH-C12) eingesetzt.

Hierbei wurden die Anfangsgeschwindigkeiten für die Fettsäure-Konzentrationen von 5 μM bis 250 μM bestimmt. Für jede Substratkonzentration wurden drei Messungen durchgeführt. Alle Ergebnisse aus den kinetischen Untersuchungen sind zusammenfassend in Abb. 5-8 dargestellt.

Wie aus der Tabelle in Abb. 5-8 (B) zu entnehmen ist, werden Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C8-C14 umgesetzt. Substrate mit Längen zwischen 10- und 12-Kohlenstoffatomen wiesen die höchsten katalytischen Effizienz auf ($0,42 \text{ min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$ und $0,29 \text{ min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$). Dies entspricht den Erwartungen, da diese Größenordnung in dem natürlich produzierten zyklischen Lipopeptid-Komplex (Faktor A21987C und Daptomycin) nachgewiesen wurde.^[184] Die verzweigt-kettigen Fettsäuren zeigten ebenfalls eine gute Akzeptanz, hier betrug die durchschnittliche katalytische Effizienz

$0,94 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$. Die β -hydroxylierte Fettsäure (3OH-C12) wurde ebenfalls von DptE umgesetzt, jedoch zeigte sich eine geringere katalytische Effizienz ($0,4 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$).

A)



B)

Substrat	$K_M (\mu\text{M})$	$k_{\text{cat}} (\text{min}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/K_M (\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1})$
linear			
C8	65.0 ± 1.2	7.2 ± 0.5	0.11 ± 0.01
C10	8.2 ± 0.4	3.4 ± 0.2	0.42 ± 0.04
C12	10.9 ± 0.3	3.1 ± 0.1	0.29 ± 0.01
C14	26.6 ± 0.9	1.3 ± 0.2	0.05 ± 0.01

Substrate C6 und C16 zeigten keine Aktivität

verzweigt

iso-C10	19.3 ± 0.5	17.9 ± 0.5	0.93 ± 0.05
iso-C12	19.2 ± 0.4	18.3 ± 0.5	0.95 ± 0.05
iso-C13	16.1 ± 0.6	15.3 ± 0.7	0.95 ± 0.08
anteiso-C12	14.1 ± 0.8	13.1 ± 0.2	0.93 ± 0.08

Substrat anteiso-C16 zeigte keine Aktivität

hydroxyliert

3OH-C12	114.2 ± 4.2	5.1 ± 0.4	0.04 ± 0.01
---------	-----------------	---------------	-----------------

ACPs

holo-DptF	29.4 ± 0.4	7.4 ± 0.2	0.25 ± 0.01
holo-LipD	135.0 ± 0.5	6.3 ± 0.3	0.05 ± 0.03
holo-AcpK	n.d.	n.d.	n.d.

Abb. 5-8. Bestimmung der katalytischen Konstanten verschiedener Substrate

A: Zeitabhängigkeiten von diversen Fettsäuren, die von DptE umgesetzt wurden.

B: Tabelle aller durchgeführten Kinetiken. n.d. nicht determiniert

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob DptE ebenfalls eine breite Substrattoleranz bezüglich des ACPs aufweist. Hierzu wurden zwei zusätzliche ACPs gewählt. Das ACP LipD aus *Actinoplanes friuliensis* (Bereitstellung von Verena Helmetag, Philipps-Universität Marburg) und das AcpK aus *B. subtilis*. LipD ist ein ACP, welches vermutlich an der Biosynthese von Friulimicin beteiligt ist. Sequenz-Alignment von LipD und DptF zeigen eine 31%ige Identität der Proteine zueinander. AcpK hingegen weist nur eine 13%ige Identität im Vergleich zu DptF auf. LipD und AcpK zeigten eine Identität von rund 18%. Alle drei ACPs weisen ein modifiziertes Kern-T Motiv (GxDS(I/L)) auf, wobei der konservierte Leucin- bzw. Isoleucin-Rest durch ein Valin substituiert ist (Anhang Abb. 8-4).^[193] Ein Coomassie Blau gefärbtes Gel der für die Kinetik-Studien eingesetzten Enzyme ist in Abbildung 5-9 zu finden.

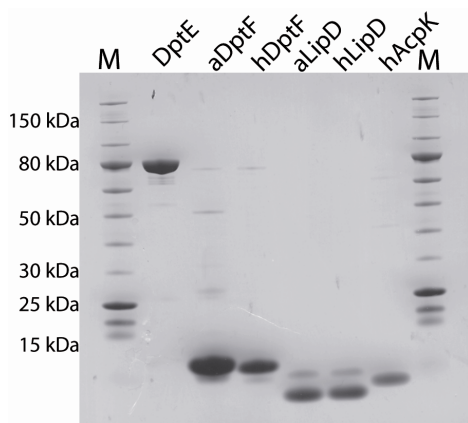


Abb. 5-9. Isolierte Enzyme für die Michaelis-Menten Kinetik zur Bestimmung der ACP-Substratspezifität.

Coomassie Blau gefärbtes SDS-PAGE Gel. DptE (80,5 kDa), aDptF (*apo*-ACP, 13,5 kDa), hDptF (*holo*-ACP, 13,8 kDa), aLipD (*apo*-ACP aus *Actinoplanes friuliensis*, 11,1 kDa), hLipD (*holo*-ACP aus *Actinoplanes friuliensis*, 11,3 kDa) und hAcpK (*holo*-AcpK aus *B. subtilis*, 10,9 kDa).

Die SDS-PAGE wurde mit einem NuPAGE 4-12% Bis-Tris-Gel der Firma Invitrogen durchgeführt. M: Proteinmarker (P7703, 10-250 kDa) der Firma NEB

LipD wurde zur besseren Bestimmung der Kinetik, wie es bereits für DptF durchgeführt wurde, im *E. coli* Stamm HM0079 exprimiert. Dadurch war es möglich auch LipD vollständig *in vivo* in der aktiven *holo*-Form zu exprimieren. AcpK lag hingegen in einem Stamm (HM404) vor, der Gsp als 4'-Ppan-Transferase aus dem Gramicidin S Biosynthesclusters von *B. brevis* ATCC 9999 koexprimierte.^{[170][194]} In diesem Stamm war es nicht möglich AcpK quantitativ in seiner aktiven *holo*-Form zu produzieren. Aus diesem Grund musste AcpK vor der Übertragungsreaktion mit Sfp in einer separaten Reaktion umgesetzt werden. Mit dieser Methode war es möglich *holo*-AcpK quantitativ zu erhalten (s. Anhang Abb. 8-1).

Erste Untersuchungen bezüglich der Modifizierung der ACPs zeigten, dass DptE in der Lage war, LipD partiell mit Dekansäure zu beladen, im Fall von AcpK allerdings konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Zum besseren Vergleich wurden für LipD Michaelis-Menten-Studien durchgeführt. Es konnten die Werte für K_M von 135 μM , k_{cat} von 6.3 min^{-1} und eine um fünffach geringere katalytische Effizienz von 0,047 $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ im Vergleich zum nativen Substrat DptF ermittelt werden.

Zusammenfassend geht aus den Versuchen hervor, dass DptE ausschließlich DptF als Substrat anstelle von Coenzym A mit Dekansäure modifiziert.

Aus den erhaltenen K_M -Werten geht hervor, dass DptE bevorzugt Substrate, die auch im natürlichen A21987C-Komplex vorkommen, umsetzt. Weiterhin ist zu erkennen, dass DptE in der Lage ist, neben seinen Hauptsubstraten eine beträchtliche Anzahl weiterer Carbonsäuren zu erkennen und zu aktivieren. Das Spektrum der aktivierten

Substrate reichte von C8- bis C14-Körpern und umfasste ebenfalls modifizierte Carbonsäuren, z. B. hydroxylierte Carbonsäuren wie 3-Hydroxy-dodekansäure und ungesättigte Fettsäuren. Hingegen konnten für Hexansäure, Palmitinsäure und 15-Methyl-hexadekansäure keine Aktivität mit der verwendeten Methode nachgewiesen werden.

Durch einen ATP-P_{PPi}-Austausch konnte gezeigt werden, dass der Mechanismus über ein Adenylat-Zwischenprodukt verläuft. Zudem war DptE in der Lage LipD mit einer fünffach geringerer Effizienz umzusetzen, wohingegen AcpK nicht akzeptiert wurde.

5.6 Untersuchungen zur Übertragungsreaktion der Fettsäure-Komponente auf das Initiationsmodul

Ein erster wichtiger Schritt in der Biosynthese von Daptomycin ist der Transfer der Fettsäurekomponente auf die erste Aminosäure Tryptophan. Da das erste Modul des NRPS-Templats mit einer Kondensationsdomäne beginnt, wird vermutet, dass diese C-Domäne die Kondensationsreaktion zwischen der Fettsäure und Tryptophan katalysiert. Um diese Hypothese genauer untersuchen zu können, sollte im Folgenden das erste Modul heterolog exprimiert werden.

5.6.1 Heterologe Expression und Isolierung des Tryptophan-aktivierenden Moduls DptA-M1

Ausgehend von den Untersuchungsergebnissen der Enzyme DptE und DptF sollte auch die Kondensationsreaktion des Startmoduls (CAT) DptA der Daptomycin-Synthetase aus *S. roseosporus* analysiert werden. Im Folgenden wird das Startmodul (CAT) als DptA-M1 bezeichnet. Dazu sollte die codierende Region mithilfe der Primer *dptA-for* und *dptA-rev* mit der Phusion-Polymerase amplifiziert werden. Verschieden Hybridisierungs-Temperaturen und –Zeiten sowie Syntheszeiten wurden ausprobiert. Eine Amplifikation von *dptA-M1* war nicht möglich. Da die Generierung von *dptA* trotz unterschiedlicher Bedingungen nicht gelang, wurde die DNA synthetisiert. Dabei erfolgte eine Codon-Optimierung für *E. coli*. Zusätzlich wurden die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen

*Bam*HI (5'-Ende) und *Not*I (3'-Ende) integriert, um einen vielseitigen Einsatz in verschiedene Expressionsvektoren zu gewährleisten (s. Abb. 8-5 im Anhang).

5.5.2 Klonierung, heterologe Expression von *dptA-M1* in *E. coli* und Isolierung von DptA

Das von der Firma EZBiolabs synthetisierte Plasmid (pBSII-SK(+)-*dptA-M1*) diente als Ausgangsvektor zur Isolierung des Gens *dptA-M1* mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Not*I (s. Abschnitt 4.1.1.7 in den Methoden). Das ca. 3,1 kb große Gen-Fragment wurde anschließend in den pQTEV-Vektor ligiert und die Expression des N-terminalen His₇-Fusionsproteins erfolgte im *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3). Die Isolierung des Enzyms erfolgte durch Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatografie. Eine anschließende SDS-PAGE und Coomassie Blau-Färbung zur Analyse wurde durchgeführt (s. Abb. 5-10)

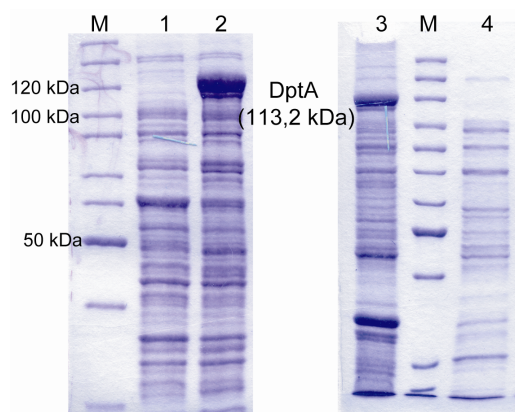


Abb. 5-10. Expression des rekombinanten DptA-M1 (CAT) in *E. coli* M15

Coomassie Blau-Färbung eines 10%igen SDS-Gels. Es wurden pro Bahn 2 µL der entsprechenden Probe aufgetragen. Bahn 1: Zellysat vor Induktion mit IPTG. Bahn 2: Zellysat nach Induktion mit IPTG. Bahn 3: Nach Aufschluss und Zentrifugation der DptA-exprimierenden Zellen (BL21) aufgetragener Rückstand (Pellet) der unlöslichen und resuspendierten Fraktion. Bahn 4: Nach Aufschluss und Zentrifugation der DptA-exprimierenden Zellen aufgetragener Überstand der löslichen Fraktion. Bahn M: Proteinmarker (PageRuler) von der Firma Fermentas.

In der Abb. 5-10 ist deutlich zu erkennen, dass das heterolog exprimierte Modul DptA-M1 unlöslich ist und in Form von Einschlusskörpern im Pellet verbleibt (Bahn 3). Sowohl Banden des Pellets als auch des Zellysats wurden aus dem SDS-PAGE-Gel separiert und eine Trypsin vermittelte Peptid-Massenfingerabdruck-Analyse durchgeführt. Das Ergebnis dieser Analyse bestätigte das beobachtete Ergebnis aus der SDS-PAGE-Analyse. Es konnte somit kein DptA-M1 in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden die Expressionsbedingungen weiter modifiziert:

- Erniedrigung der Expressionszeiten bis max. 2 Stunden
- Verringerung der Expressionstemperatur auf 25°C

- Reduktion der IPTG-Konzentration
- Zugabe von Tryptophan in das Expressionsmedium (10 mM Endkonzentration)
- Autoinduktion

Die verschiedenen Bedingungen wurden erst einzeln durchgeführt und anschließend miteinander variiert, aber es konnte kein lösliches Protein erhalten werden.

5.6.3 Expression von DptA-M1 als GST-Fusionsprotein

Da die heterologe Expression His₇-tag DptA-M1-Fusionsproteins als unlösliches Protein resultierte, sollte die *dptA*-Sequenz in ein anderes Vektor-System kloniert werden. Eine Möglichkeit stellt die Expression als GST-Fusionsprotein dar. Hierzu wurde das Vektorsystem pGex-4T-1 gewählt. Die Klonierung in das GST-Fusionssystem erfolgte, wie es bereits für das pQTeV-System beschrieben wurde, über hydrolytische Spaltung und anschließende Ligation (s. Abschnitt 5.6.2).

Des Weiteren wurde zusätzlich das Expressionssystem gewechselt. Die Expression des Fusionsproteins GST-DptA-M1 erfolgte in ArcticExpress™ Zellen (Stratagene). Das Besondere an diesem System ist, dass die Bakterien bei geringen Temperaturen (bis max. 8°C) kultiviert werden können. Zusätzlich koexprimieren diese Zelle die Kälte-angepassten Chaperone Cpn10 und Cpn60 aus *O. antarctica*, die eine optimale Aktivität bei Temperaturen zwischen 4-12°C aufweisen.^[195] Die Chaperone unterstützen die Faltung des exprimierten Proteins und können dadurch dessen Löslichkeit verbessern.

Die Expression des Konstruktes erfolgte somit in den ArcticExpress™ Zellen. Nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Expression durch IPTG (0,05 mM Endkonzentration) gestartet. Die Expression wurde bei 10°C und für 36 Stunden durchgeführt. Die Isolation des Zielproteins erfolgte nach dem gleichen Verfahren, wie es bereits für DptE beschrieben wurde. Das resultierende Protein DptA (135 kDa) umfasste sowohl die C-, A und T-Domäne (s. Abb. 5-11).

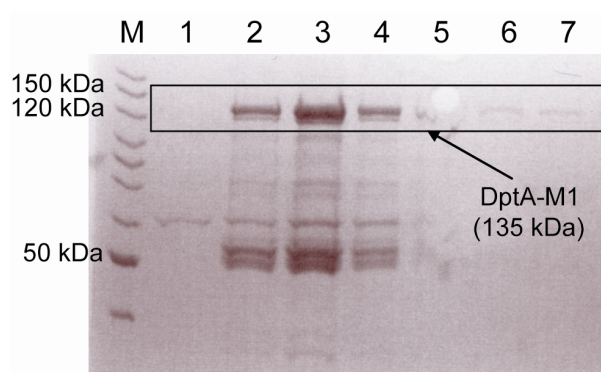


Abb. 5-11. Expression und Isolierung von DptA-M1 als GST-Fusionsprotein

Coomassie Blau-Färbung eines 10%igen SDS-Gels. Es wurden pro Bahn 2 μ L der Elutionsfraktion als Probe aufgetragen. Die Expression von DptA-M1 erfolgte als GST-Fusionsprotein in ArcticExpress™ Zellen. Bahnen 1-7 sind die Elutionsfraktionen nach Reinigung des Zelllysats durch GST-Affinitätschromatografie. Die schwarze Umrandung markiert das lösliche und gereinigte DptA-M1-Protein (CAT). Bahn M: Proteinmarker (PageRuler) von Fermentas.

Die Expression in den ArcticExpress™ Zellen und die Fusionierung von DptA-M1 mit einem N-terminalen GST-tag zeigten eine deutliche Steigerung der exprimierten und löslichen DptA-Menge gegenüber herkömmlichen Expressionsverfahren. Aus Abb. 5-11 geht hervor, dass sich in den Elutionsfraktionen ein Protein mit der Größe um 135 kDa befindet. Eine tryptische Fingerprint-Analyse bestätigte, dass es sich bei diesem Protein um DptA-M1 handelt.

Da DptA-M1 teilweise in löslicher Form erhalten werden konnte, wurde zunächst überprüft, ob das PCP beladen werden kann. Hierzu wurde ein Fluoresceinyl-CoA-Beladungsassay, analog zu dem in Abschnitt 5.3.4 beschriebener Versuch, durchgeführt (Abb. 5.11).

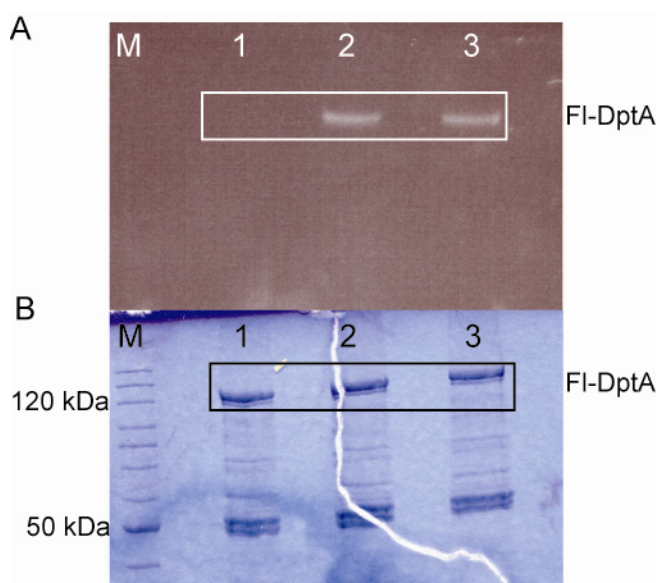


Abb. 5-12. Voruntersuchungen zur Aktivitätsüberprüfung von DptA-M1

In vitro 4'-Phosphopantetheinylierung von apo-PCP des Moduls DptA-M1 durch die 4'-Ppan-Transferase Sfp aus *B. subtilis*. Reaktionsgemische wurden jeweils mit Sfp (Bahnen 2 und 3) und ohne Sfp (Bahn 1) inkubiert und anschließend durch SDS-PAGE (10%iges SDS-Gel) getrennt. **A:** UV-Licht-Durchleuchtung bei 312 nm des ungefärbten SDS-Gels zur Überprüfung der Beladung des PCPs mit Fluoresceinyl-CoA durch Sfp. **B:** Nach UV-Licht-Bestrahlung Coomassie Blau gefärbtes. Bahn M: Proteinmarker (PageRuler) von Fermentas. Bahnen 1 und 2 entsprechen den gleichen Bedingungen. FI-DptA: Fluoresceinyl-DptA-M1

Aus Abb. 5.11 geht deutlich hervor, dass es möglich war, das PCP aus DptA-M1 mit Sfp und Fl-CoA zu modifizieren. Als Nächstes wurde überprüft, ob die A-Domäne Aktivität aufweist. Hierzu wurde eine ATP-PPi-Austauschreaktion durchgeführt. Das Ergebnis fiel negativ aus. Eine Aktivität mittels der ATP-PPi-Austausch-Methode konnte nicht nachgewiesen werden.

Da sich die PCP-Domäne jedoch mit Sfp beladen ließ, und die Vermutung darin bestand, dass die A-Domäne nicht aktiv war, wurde ein Ansatz gewählt, der unabhängig von der Aktivität der A-Domäne war. Hierzu wurde Tryptophan-CoA generiert und in einer ersten Reaktion durch Sfp auf das PCP übertragen. In einer zweiten Reaktion wurde das DptF mit Dekansäure durch DptE beladen. Anschließend wurden die beiden Reaktionsgemische zusammengegeben und für 30 min bei 30°C inkubiert. Danach erfolgte eine basische Hydrolyse zur Abspaltung des Dekansäure-Trps vom PCP. Nach Fällung der Proteine erfolgte eine Produktanalyse mittels HPLC-MS. Eine Entstehung des Kondensationsproduktes katalysiert durch die C-Domäne, konnte nicht nachgewiesen werden.

In zukünftige Untersuchungen sollte die Expression des ersten Moduls in einem anderen, für GC-reiche DNA-Sequenzen besser geeigneter Organismus, z. B. *Pseudomonas*, durchgeführt werden.^[196] Eine weitere Möglichkeit könnte die Teilung der einzelnen Domänen von DptA-M1 in die C-Domäne, PCP-Domäne und A-Domäne darstellen.

6 Ergebnisse II: Untersuchungen zur Acylierung von Surfactin

Surfactin ist ein Lipoheptapeptid-Antibiotikum, d. h. es besitzt eine Lipo- und eine Peptideinheit. Eine Besonderheit ist auch in diesem Fall wiederzuerkennen: Das erste Modul von Surfactin enthält N-terminal eine C-Domäne. Über die tatsächliche Funktion dieser Starter-C-Domäne ist bis heute wenig bekannt. Man kann lediglich aus dem Vergleich anderer C-Domänen von nichtribosomalen Peptidsynthetasen schließen, dass auch hier das Substrat ein CoA-aktiviertes Produkt darstellen könnte. Zu Beginn der Promotionsarbeit war bereits bekannt, dass die Starter-C-Domäne des ersten Moduls CoA-Fettsäure-Substrate akzeptiert und damit die Surfactin-Produktion eingeleitet werden kann.^[141] Weiterhin war auch bekannt, dass das *srf*-Operon alle notwendigen Gene zur Surfactin-Produktion aufweist. Allerdings konnten keine Gene zur Initiationsreaktion in der Umgebung des *srf*-Operons lokalisiert werden.

Ebenfalls gibt es keine Hinweise auf welchem biochemischen Weg und mit welchen Enzymen die Fettsäure aktiviert und auf das erste Modul übertragen wird. Daher war eine wichtige Fragestellung dieser Arbeit die Suche nach beteiligten Enzymen der Surfactin Initiationsreaktion.

Die folgenden Ergebnisse dienten als Grundlage für die Diplomarbeit von Femke Kraas (Arbeitsgruppe Prof. Marahiel, Philipps-Universität Marburg).^[197] In dieser Diplomarbeit wurden einige der Ergebnisse wiederholt, verfeinert und weiterentwickelt.

6.1 Bioinformatische Identifizierung putativer Acyl-CoA-Synthetasen der Surfactin-Biosynthese

Um potenzielle Kandidaten für die Surfactin-Fettsäure-Initiationsreaktion zu finden, wurde die Genomsequenz von *B. subtilis* nach Genen potenzieller Enzyme hin untersucht. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf Gensequenzen dessen Produkte hohe Ähnlichkeiten zu Fettsäure Acyl-CoA-Ligasen/Synthetasen aufwiesen. Dies hatte den Hintergrund, wie bereits eingangs erwähnt, dass die Starter-C-Domäne β -Hydroxy-myristinyl-CoA als Substrat akzeptierte. Zudem ist aus PKS-

Systemen bekannt gewesen, dass ebenfalls CoA-Spezies von Initiationsmodulen transferiert werden.^{[141][198]}

Homologieuntersuchungen führten zu vier putativen Genen: *lcfA*, *yhfL*, *yhfT* und *yngl* die Ähnlichkeiten zu Enzymen, die am Fettsäurestoffwechsel beteiligt sind, aufweisen. In Tab. 6-1 sind zusammenfassend die postulierten Funktionen dieser Enzyme wiedergegeben.^[143]

Tab. 6-1. Eigenschaften der potenziellen Enzyme, die möglicherweise an der Surfactin-Initiation beteiligt sind

Enzym	Vermutete Funktion	Gen (kb)	Protein (kDa)
LcfA	langkettige Acyl-CoA-Synthetase	1680	62,5
YhfL	unbekannte Funktion, hohe Ähnlichkeit zu langkettigen Acyl-CoA-Ligasen	1539	56,4
Yngl	Ähnlichkeiten zu langkettigen Acyl-CoA-Synthetasen	1647	61,3
YhfT	Ähnlichkeit zu langkettigen Acyl-CoA-Ligasen	1437	52,7

Homologieuntersuchungen der Proteinsequenzen in den Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI) bei dem der Blast Algorithmus (BlastP)^[199] verwendet wurde, zeigte hohe Homologien der postulierten Enzyme zu anderen FACS. Zum Homologie-Vergleich wurde FadD aus *E. coli* verwendet, da dieses Enzym eingehend in der Literatur beschrieben ist. FadD aus *E. coli* ist am Transport von Fettsäuren beteiligt und katalysiert unter Verbrauch von ATP die Aktivierung von Fettsäuren zu Acyl-CoA-Thioestern. Zusätzlich setzt FadD Fettsäuren verschiedener Länge und Sättigungsgrad um.^[200] In Acyl-CoA-Synthetasen gib es zwei charakteristische Motive: das ATP/AMP-Bindungsmotiv und das FACS-Motiv. Ein Sequenz-Alignment mit FadD aus *E. coli* ergab, dass die Enzyme LcfA, YhfL, Yngl und YhfT ebenfalls diese zwei Bindungsmotive (vgl. Abb. 8-7 und Abb. 8-8 im Anhang) aufweisen. Die Ergebnisse der Sequenzähnlichkeitsuntersuchung der Enzyme mit FadD sind in Tab. 6-2 zusammengefasst.

%	FadD	LcfA	YhfL	YhfT
LcfA	38,2			
YhfL	38,8	39,8		
YhfT	21,7	26,9	25,3	
Yngl	26,2	30,6	33,5	24,6

Tab. 6-2. Homologievergleich der Enzyme LcfA, YhfL, Yngl und YhfT mit FadD aus *E. coli*

Die höchste Identität mit FadD besitzen LcfA und YhfL mit ca. 38%. Yngl weist eine Identität von 26% auf und YhfT hingegen hat die geringste Identität von 22% zu FadD. Diese Eigenschaften werden auch im Vergleich der potenziellen Enzyme untereinander wiedergegeben: LcfA, YhfL und Yngl besitzen die geringste Identität (unter 30 %) gegenüber YhfT. LcfA und YhfL hingegen zeigen mit rund 40% die höchste gegenseitige Identität.

Um die vermutete enzymatische Aktivität der identifizierten Kandidaten *in vitro* nachzuweisen, sollten die Enzyme rekombinant produziert und biochemisch untersucht werden.

Bacillus subtilis sp. MR168, welcher vollständig sequenziert ist, konnte für die folgenden Untersuchungen nicht verwendet werden, da dieser kein natürlicher Surfactin-Produzent ist. Stattdessen wurde der *Bacillus*-Stamm ATCC 21332 verwendet. Allerdings wurde die DNA-Sequenz von *B. subtilis* MR168 als Vorlage zur Synthese von Primern und Klonierungsversuchen *in silico* verwendet. Die Sequenzierung aller Genkonstrukte zeigte eine hohe Sequenz-Ähnlichkeit zu dem bisher beschriebenen MR168 Stamm.

6.2 Heterologe Expression und Isolierung von LcfA

Die Generierung des Vektors erfolgte in Zusammenarbeit mit Dipl. Chem. Svetlana Gez (Arbeitsgruppe Marahiel, Philipps-Universität Marburg). Das *lcfA*-Gen wurde aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* ATCC 21332 amplifiziert und in den Vektor pQE60 ligiert. Der erhaltene Vektor wurde zur Expression in den *E. coli*-Stamm M15/pRep4 transformiert. Die Reinigung erfolgte mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatografie. Das C-terminale His₆-Tag-Fusionsprotein mit einem

molekularen Gewicht von 67,7 kDa befand sich nach Reinigung in der löslichen Phase. Dies wurde ermittelt durch SDS-PAGE und anschließende Coomassie Blau-Färbung (s. Abb. 6-1). Die Ausbeute pro Liter Fermentationskultur betrug 1,7 mg.

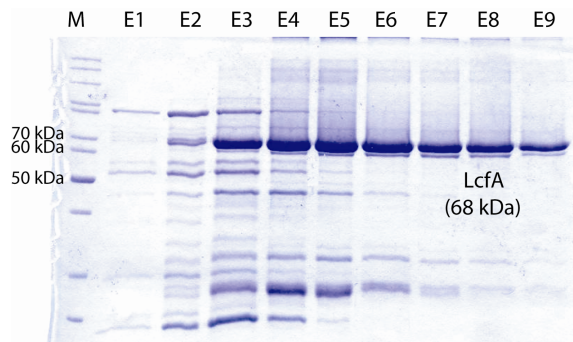


Abb. 6-1. Heterologe Expression und Isolierung des rekombinanten His₆-Tag-Fusionsproteins LcfA in *E. coli*.

Coomassie Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel. Es wurden jeweils 2 µL Protein aus Elutionsfraktionen der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatografie auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen (Bahn E1-E9). Vereinigt und weiterverwendet wurde nur mit den Elutionsfraktionen E6-E9. Bahn M: Proteinmarker (PageRuler) von der Firma Fermentas.

6.3 Heterologe Expression und Isolierung von YhfL und YngI

Die Amplifikation der Gene *yhfL* (1,5 kb) und *yngI* (1,7 kb) erfolgte aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* ATCC21332. Die Gene wurden in den pBAD102/D-TOPO-Vektor ligiert und in den *E. coli*-Zellen BL21(DE3) exprimiert. Die heterolog produzierten Fusionsproteine (N-terminales Thioredoxin und C-terminales Hexahistidin) wurde mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatografie gereinigt und durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie Blau-Färbung analysiert (s. Abb. 6-2).

Die elektrophoretische Beweglichkeit der rekombinanten Proteine stimmte mit den berechneten Molekulargewichten in beiden Fällen überein (YhfL: 73,6 kDa; YngI: 78,5 kDa). Die Ausbeuten der Proteine aus 1 L Fermentationskultur betrugen für YhfL 4,5 mg und YngI 1,4 mg. Proteinfractionen mit homogenen Reinigungsgrad wurden vereint und gegen HEPES A-Puffer dialysiert.

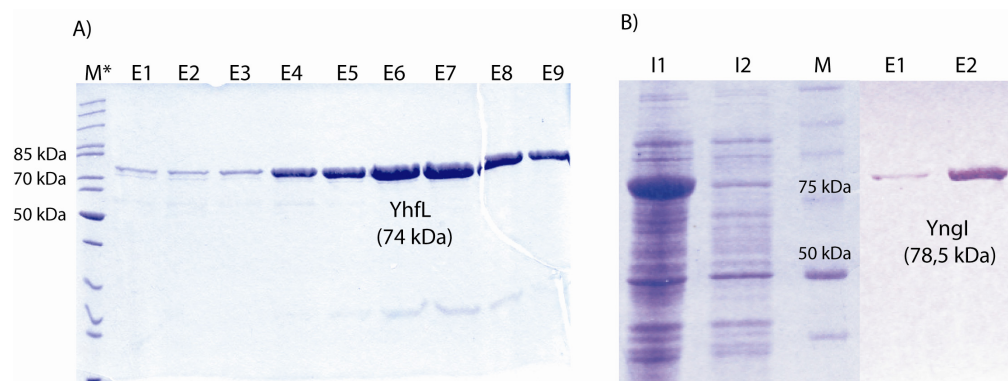


Abb. 6-2. Heterologe Expression und Isolierung von YhfL und YngI

Coomassie Blau gefärbtes SDS-PAGE-Gel. Es wurden jeweils 2 μ L Elutionsfraktion aufgetragen.

A) Elutionsfraktionen von YhfL (E1-E9) nach Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatografie. Alle Elutionsfraktionen wurden weiterverwendet.

B) Induktionsproben und Reinigung von YngI. I1: Probe nach Induktion mit IPTG (2 μ L Kultur wurde aufgetragen). I2: Probe vor Induktion mit IPTG (4 μ L Kultur wurde aufgetragen). E1 und E2: Elutionsfraktionen nach Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatografie. Alle Elutionsfraktionen wurden weiterverwendet.

M*: Proteinmarker (PageRuler) der Firma Fermentas.

M: Proteinmarker (V8491) der Firma Promega

6.4 Klonierung und Expression des Gens *yhfT*

Die Klonierung des Gens *yhfT* in Klonierungsvektoren und Expressionsvektoren, die Expression und die anschließende biochemische Untersuchung wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Femke Kraas durchgeführt.^[197]

6.5 Biochemische Charakterisierung von LcfA, YhfL und YngI

Zur initialen Charakterisierung wurden die Enzyme LcfA, YhfL und YngI bezüglich ihrer Adenylat-bildenden Aktivität untersucht. Die Untersuchung erfolgte, wie bereits für DptE erwähnt, durch einen ATP-PPi-Austausch.

6.5.1 ATP-PPi-Austauschreaktion

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte entsprechend der unter Methoden beschriebenen Verfahren, die eingesetzten Enzymmengen betrugen jeweils 200 nM bis 1 μ M. Untersucht wurde die Adenylierungsreaktion der β -Hydroxy-myristinsäure.

Die Verwendung von β -Hydroxy-myristinsäure basiert auf der Grundlage, dass diese Fettsäure ein natürlicher Bestandteil der Surfactin-Derivate aus *B. subtilis* ist.

Es konnte für alle drei Enzyme keine Aktivierung nachgewiesen werden. Die Inkubationszeit und auch die eingesetzte Enzymmenge wurden in weiteren Versuchen erhöht. Selbst nach einer einstündigen Inkubationszeit war der Gehalt an radioaktiv gebildeten ATP im Assay-Ansatz gleich hoch wie die dazugehörige Kontrolle ohne Carbonsäuresubstrat (Daten nicht gezeigt).

6.5.2 Entwicklung des Fettsäure-Aktivierungs-Assays

Da der enzymatische Aktivitätsnachweis mittels ATP-PPi-Austauschreaktion keine Ergebnisse lieferte, wurde eine weitere Methode basierend auf HPLC-MS-Analyse als Nachweis gewählt. Die aus Abschnitt 6.2 und 6.3 isolierten Proteine wurden zur biochemischen Charakterisierung eingesetzt. Da die putativen Enzyme Homologien zu FAAL und vor allem zu FACS-Enzymen aufweisen, wurde daher zunächst, an den aus der Literatur bekannten Assay-Bedingungen modifiziert und auf das zu untersuchende System angewendet.^[201-204] Zunächst wurde die Aktivität der rekombinanten Proteine *in vitro* in Gegenwart von ATP, CoA, Mg^{2+} und β -Hydroxy-myristinsäure gemessen. Um eine bessere Löslichkeit der Fettsäurekomponente zu erhalten, wurde zusätzlich DMSO (1-5% Endkonzentration) verwendet. Die Identifizierung der Produkte erfolgte mittels HPLC-MS. Dabei wurde ein Massenbereich zwischen 100 und 1000 Da gewählt. Identifiziert wurden die Produkte durch die Extraktion der Massen aus dem Gesamtspektrum (Extract-Ion-Methode). Erstmals zu erkennen ist, dass die beiden putativen CoA-Synthetasen in der Lage sind, die Fettsäuren β -Hydroxy-myristinsäure als Thioester ($m/z = 992,3$ $[M-H]^-$ gemessen; $m/z = 992,0$ $[M-H]^-$ berechnet) zu aktivieren. In einer Kontrolle ohne Enzyme fand keine Produktbildung statt (rote Linie). Die Ergebnisse sind in Abb. 6-3 zu sehen. YngI zeigte hingegen weder eine Aktivierung der Fettsäure als CoA-Derivat noch als Adenylat (Daten nicht gezeigt).

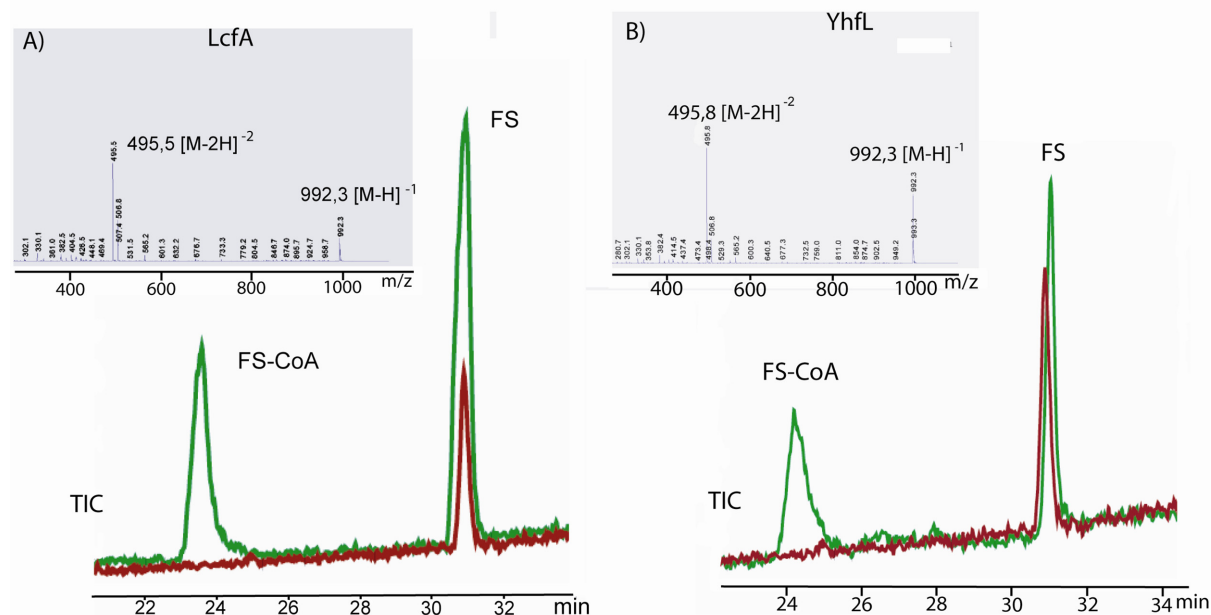


Abb. 6-3. Aktivitätsmessung der Enzyme LcfA und YhfL mit 3-Hydroxy-myristinsäure

HPLC-MS-Analyse der Fettsäureaktivierungsreaktionen von LcfA (A) und YhfL (B). Gezeigt ist ein Ausschnitt (20-34 min) der Totalionenchromatogramme im negativen Detektionsmodus der im Bereich von 100-1000 Da gescannten Massen und das dazugehörige ESI-Spektrum des Produktes. Die rote Kurve entspricht der Kontrollreaktion ohne Enzym. Die in grün dargestellte Kurve entspricht der Reaktion mit Enzym. FS = β -Hydroxy-myristinsäure, FS-CoA = β -Hydroxy-myristoyl-CoA, TIC = total ion count (Gesamtionenstrom)

Ein weiterer Aspekt dieser Untersuchung stellte die Evaluierung der Substratspezifitäten dar. Um dies zu untersuchen, wurde zum einen die Dekansäure, als einfache Säure ohne zusätzliche Hydroxy-Gruppe gewählt und zum anderen die Butansäure als kurzkettige Fettsäure. Dabei wurden die gleichen Reaktionsbedingungen wie bei dem Assay mit der β -Hydroxy-myristinsäure verwendet. Die Assay-Bedingungen mit der Butansäure zeigten keine Aktivität (Daten nicht gezeigt). Hingegen war bei der Verwendung von der Dekansäure Produktbildung in Form des CoA-Thioesters zu erkennen ($m/z = 920,2$ [M-H]⁻ gemessen; $m/z = 920,0$ [M-H]⁻ berechnet). Im Reaktionsansatz mit dem Enzym LcfA konnte ausschließlich das CoA-Derivat detektiert werden, hingegen wurde im Ansatz mit YhfL die Fettsäure als AMP-Derivat identifiziert ($m/z = 520,1$ [M-H]⁻ gemessen; $m/z = 520,4$ [M-H]⁻ berechnet). Der Assay-Ansatz mit Yngl und beiden Fettsäuren zeigte keine enzymatische Aktivität. Die Ergebnisse sind in Abb. 6-4 wiedergegeben.

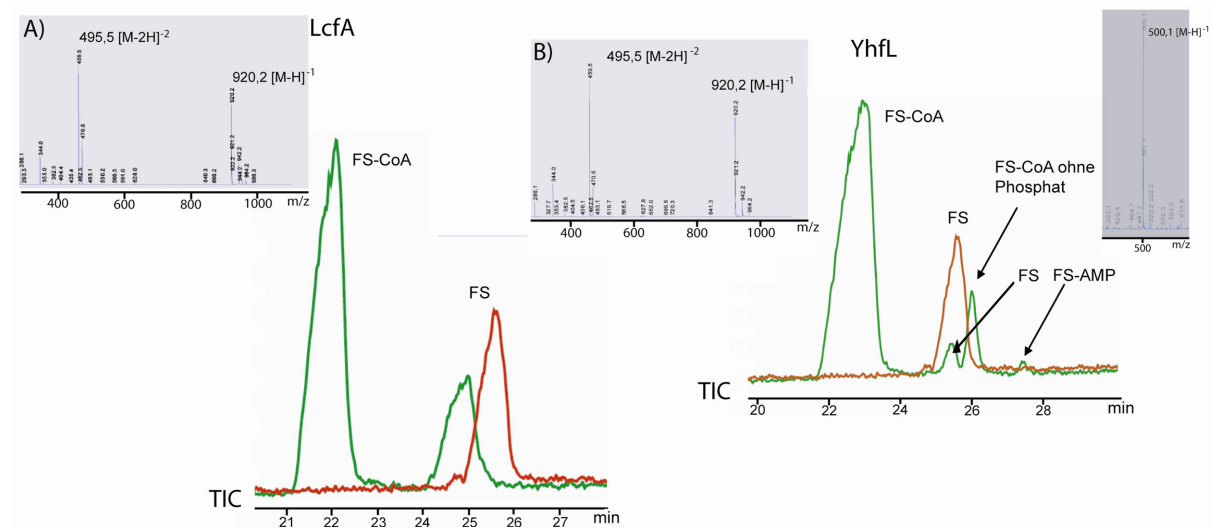


Abb. 6-4. Aktivitätsmessung der Enzyme LcfA und YhfL mit Dekansäure

HPLC-MS-Analyse der Fettsäureaktivierungsreaktionen von LcfA (A) und YhfL (B). Gezeigt ist ein Ausschnitt (20-32 min) der Totalionenchromatogramme im negativen Detektionsmodus der im Bereich von 100-1000 Da gescannten Massen und das dazugehörige ESI-Spektrum des Produktes. Die rote Kurve entspricht der Kontrollreaktion ohne Enzym. Die in grün dargestellte Kurve entspricht der Reaktion mit Enzym. FS = Dekansäure, FS-CoA = Dekanoyl-CoA, TIC = total ion count (Gesamtionenstrom)

Da für das Enzym LcfA kein AMP-Zwischenprodukt detektiert werden konnte, wurde speziell für dieses Protein der Assay mit der Dekansäure wiederholt. In einem Ansatz wurde ATP und in einem weiteren CoA durch Puffer substituiert. Die Reaktionsbedingungen wurden beibehalten, nur zur besseren Bestimmung der Produkte und Zwischenstufen durch Akkumulation, wurde die Reaktionszeit auf 45 min erhöht. In Abb. 6-5 sind die Ergebnisse dargestellt.

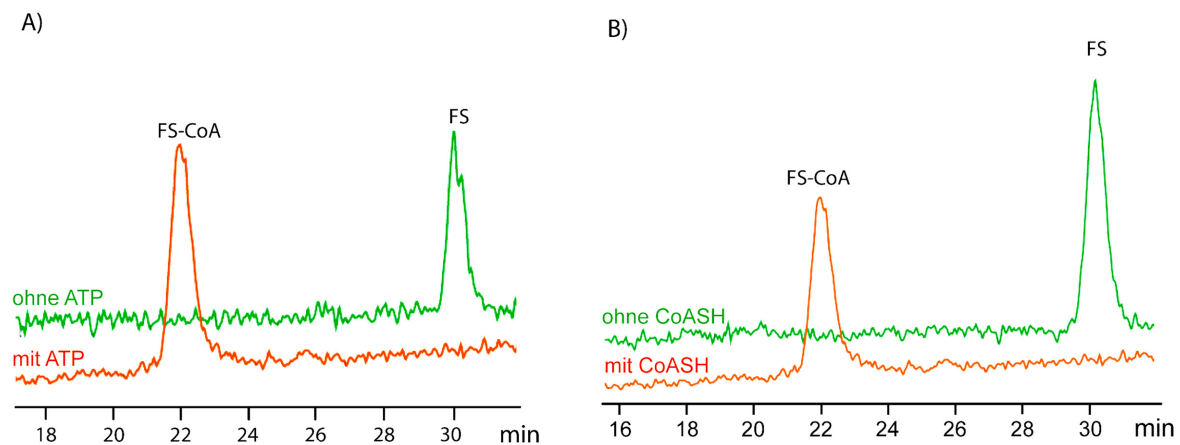


Abb. 6-5. TIC-Chromatogramme der Aktivitätsmessung von LcfA ohne ATP und ohne Coenzym A

HPLC-MS-Analyse der Fettsäureaktivierungsreaktionen von LcfA ohne ATP (A) und ohne CoA (B). Gezeigt ist ein Ausschnitt (16-32 min) der Totalionenchromatogramme im negativen Detektionsmodus der im Bereich von 100-1000 Da gescannten Massen. Die rote Kurve entspricht der Kontrollreaktion mit allen Reaktionskomponenten. Die in grün dargestellte Kurve entspricht der Reaktion entweder ohne ATP oder ohne CoA. FS = Dekanoyl-CoA, FS-CoA = Dekanoyl-CoA, TIC = total ion count (Gesamtionenstrom)

Aus der obigen Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass LcfA weder ohne ATP, noch ohne CoA in der Lage war, die Fettsäure entsprechend zu modifizieren. Zudem wurde die Dekansäure nach einer Reaktionszeit von 45 min vollständig umgesetzt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Enzyme LcfA und YhfL *in vitro* die erwarteten Aktivitäten zeigten. Im Falle von YhfL konnte sowohl das Zwischenprodukt, das AMP-Derivat, als auch das gemischte Anhydrid (FS-CoA) nachgewiesen werden. Im Falle von LcfA konnte nur das Endprodukt mit der verwendeten HPLC-MS-Methode detektiert werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass beide Enzyme in der Lage waren abweichend von der natürlichen Fettsäure von Surfactin auch Dekansäure zu modifizieren, welche keine β -Hydroxy-Gruppe enthielt. Im Fall von LcfA konnte auch gezeigt werden, dass keine Reaktion ohne ATP oder CoA stattfand. Für YngI konnte keine Aktivität nachgewiesen werden.

6.5.3 Aktivierung und Übertragung der β -Hydroxy-myristinsäure auf ein ACP

Da für YngI bislang keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurde eine neue Strategie entwickelt. Wie am Beispiel von DptE und DptF eine Aktivierung der Fettsäure als AMP-Derivat und anschließende Übertragung auf das ACP nachgewiesen werden konnte (s. Ergebnisse I, Abschnitt 5), wurde für YngI eine DptE-ähnliche Eigenschaft vermutet.

Da in der näheren Umgebung des Gens *yngI* kein Carrier-Protein identifiziert werden konnte, wurde ein Ansatz mit dem ACP AcpK aus *B. subtilis* gewählt. Die Reaktionsbedingungen richteten sich nach den Bedingungen, wie sie für DptE und DptF gewählt wurden. Eine Übertragungsreaktion der β -Hydroxy-myristinsäure auf AcpK durch YngI konnte jedoch nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

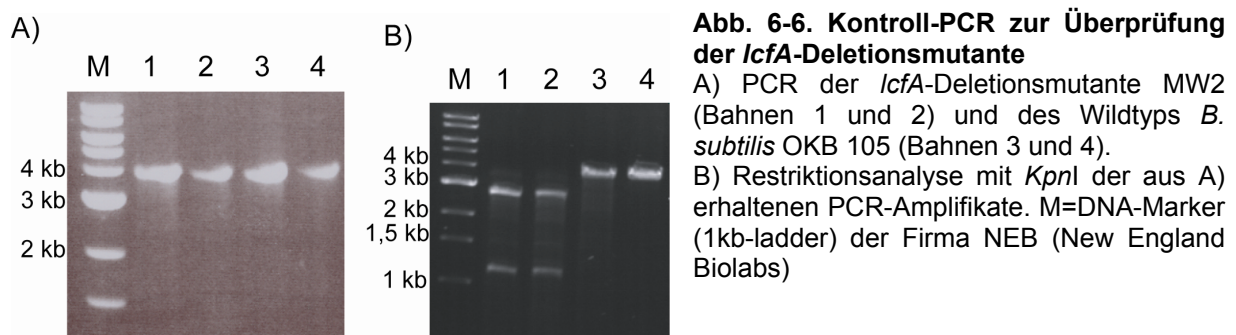
6.6 Konstruktion von Deletionsmutanten in *B. subtilis* OKB105

Da die aus Abschnitt untersuchten Enzyme *in vitro* enzymatische Aktivität zeigten, wurde untersucht, ob die postulierten Enzyme *in vivo* die Lipidierung des Surfactins katalysieren. Um den Zusammenhang zwischen FACS und der Surfactin-Biosynthese zu untersuchen, sollten in den folgenden Versuchen Deletionsmutanten der Gene *lcfA*, *yhfL*, *yngI* und *yhfT* generiert und die Mutantenstämme auf Surfactin-Produktion hin untersucht werden. Aus dem *Bacillus subtilis* Genomprojekt war bereits bekannt, dass die Einfachdeletionen der entsprechenden Gene im MR168-Stamm nicht essenziell waren.^[143] Die MR168-Deletionsmutanten aus dem Genomprojekt konnten nicht verwendet werden, da *B. subtilis* MR168 wegen der Mutation im *sfp*-Gen generell nicht in der Lage war Surfactin zu produzieren. Zur Deletion der Gene wurde der Stamm OKB105 gewählt. Ein Grund war, dass der *B. subtilis* Stamm OKB105 zweifach mehr Surfactin erzeugt als der Stamm ATCC21332, und damit drastischere Auswirkungen auf die Surfactin-Produktion durch Deletion vermutet wurde.^[68] Ein weiterer Grund war, dass sich durch Vorversuche zur Transformation von DNA-Sequenzen OKB105 als genetisch zugänglicher erwies (C. Chiocchini, Dissertation 2006)^[205] Die Erzeugung der Deletionsmutanten sollte durch homologe Rekombination mit entsprechenden DNA-Fragmenten erfolgen.

6.6.1 Konstruktion der *B. subtilis* Deletionsmutante $\Delta lcfA$

Zunächst wurde die codierende Sequenz von *lcfA* in *B. subtilis* OKB105 deletiert, indem sie gegen die codierende Sequenz der *mls*-Kassette ausgetauscht wurde. Zur Generation der Deletionsmutante $\Delta lcfA$ aus *B. subtilis* OKB105 wurden die entsprechenden stromaufwärts- und stromabwärts-Bereiche des zu deletierenden Gens mit den Primern PMW3 und PMW4 (stromaufwärts), bzw. PMW5 und PMW6 (stromabwärts) amplifiziert. Die *mls*-Resistenzkassette wurde aus dem Vektor pDG646 und mit den Primern 5'*mls*646 und 3'*mls*646 generiert. Die so erhaltenen Amplifikate wurden mit der *mls*-Resistenzkassette fusioniert (s. Abschnitt 4.1.6 in den Methoden).

Das Fusions-PCR-Produkt wurde durch Reinigung von DMSO befreit und in *B. subtilis* OKB105 transformiert. Die Selektion erfolgte durch Ausplattieren der Transformanten auf Erythromycin- und Lincomycin-haltigen DSM-Agarplatten. Im Fall der *lcfA*-Deletionsmutante gestaltete sich die Identifikation nicht trivial, da *lcfA* und die *mls*-Kassette mit ca. 1,7 kb nahezu identisch waren. Allerdings enthielte das *lcfA*-Gen eine *KpnI*-Erkennungssequenz, die die Resistenzkassette nicht enthielte (s. Abb. 6-6). Aus den erhaltenen Klonen wurden mittels Colony-PCR mit den Primern PMW3 und PMW6 ein Amplifikat generiert, das anschließend durch eine Restriktions-Analyse mit *KpnI* auf den Erfolg der homologen Rekombination untersucht wurde. Die aus diesem Versuch resultierende Deletionsmutante, die anstatt *lcfA* eine *mls*-Resistenzkassette enthielt, wurde MW2 genannt.



6.6.2 Konstruktion der *B. subtilis* Deletionsmutanten $\Delta yhfT$ und $\Delta yngI$

Die Konstruktion der Einfach-Deletionsmutanten richtete sich nach dem Vorgehen, wie es bereits für die Deletionsmutante MW2 beschrieben ist. Allerdings erfolgte der Austausch von *yhfT* gegen die Spectinomycin-Kassette und im Fall von *yngI* gegen die Tetracyclin-Kassette. Die Amplifizierung der stromaufwärts- und stromabwärts-Bereiche wurde mit den Primern PMW1, PMW2, PMW11 und PMW12 für *yhfT* und PMW8, PMW9, PMW10 und PMW16 für *yngI* durchgeführt. Die Amplifikation der Spectinomycin-Resistenzkassette erfolgte mit den Primern 5'spc1726 und 3'spc1726 und dem Vektor pDG1726. Die Tetracyclin-Kassette wurde mit den Primerpaaren 5'tet1514 und 3'tet1514 aus dem Plasmid pDG1514 generiert. Eine anschließende PCR-Analyse bestätigte die erfolgreiche homologe Rekombination und damit die Integration der entsprechenden Resistenz-Kassette in das Genom. Eine Restriktions-Analyse brauchte im Fall von *yngI* nicht durchgeführt zu werden, da sich die Größe der entsprechenden Resistenzkassette von dem des nativen Gens deutlich unterschied. Die Spectinomycin-Kassette besaß eine Größe von 1,25 kb und *yhfT* von 1,44 kb. Damit war das Amplifikat erhalten durch die Primer PMW11 und PMW12 der Mutante um 200 bp kleiner und konnte mittels Agarosegelelektrophorese nicht deutlich vom nativen System unterschieden werden. Daher erfolgte nach der PCR eine Restriktionsanalyse mit *KpnI*. Das native Amplifikat, also ohne Resistenzkassette war unempfindlich gegenüber *KpnI*. Hingegen zeigte das Amplifikat mit der *spc*-Resistenzkassette ein Spaltungsmuster mit zwei Banden mit einer Größenordnung von 1,6 kb und 1,8 kb. Dieses Bandenmuster lässt sich durch Agarosegelelektrophorese eindeutig analysieren. Im Fall der *yngI*-Deletionsmutante erfolgte die Identifikation allein durch PCR mit den Primern PMW10 und PMW16. Das PCR-Produkt der Mutante betrug ca. 3,6 kb und das des nativen Systems 4,2 kb. Somit war hier ein deutlicher Größenunterschied vorhanden (s. Abb. 6-7). Die aus diesem Versuch erhaltene Deletionsmutante die anstelle von *yhfT* eine Spectinomycin-Kassette enthielt, wurde MW3 und die Deletionsmutante, die statt *yngI* eine Tetracyclin-Resistenzkassette enthielt, MW1 genannt.

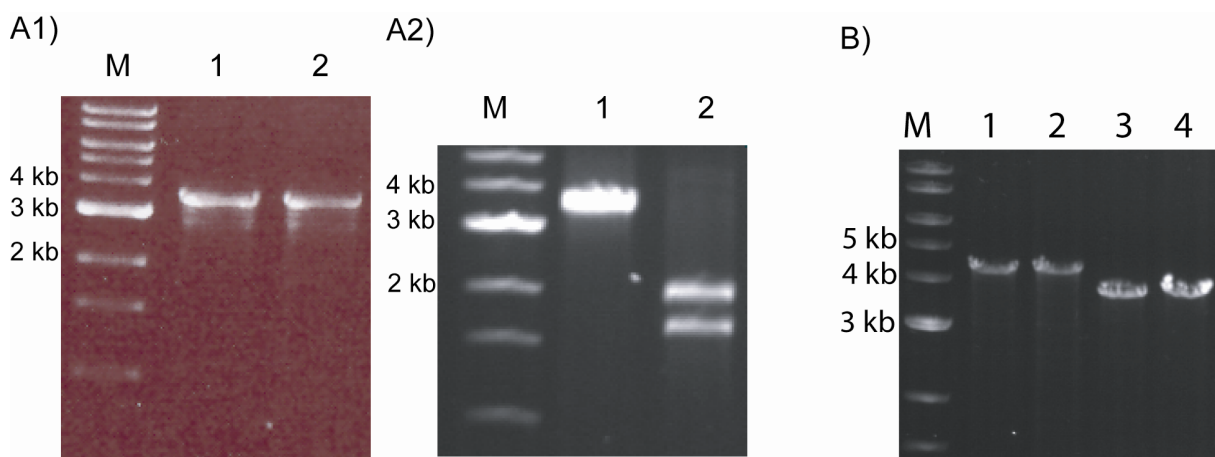


Abb. 6-7. Kontroll-PCR zur Überprüfung der *yhfT*- und *yngI*-Deletionsmutanten

A1) PCR des Wildtyps *B. subtilis* OKB 105 (Bahn 1) und der *yhfT*-Deletionsmutante MW3 (Bahn 2).

A2) *KpnI*-Restriktionsanalyse der aus A1) erhaltenen PCR-Amplifikate. Bahn 1: *KpnI*-Restriktionsmuster des Wildtyps *B. subtilis* OKB 105 Bahn 2: *yhfT*-Deletionsmutante MW3, die eine *KpnI*-Erkennungssequenz enthält.

B) PCR des Wildtyps *B. subtilis* OKB105 (Bahnen 1 und 2) und der *yngI*-Deletionsmutante (Bahnen 1 und 2), M = DNA-Marker (1kb-ledder) der Firma NEB

6.6.3 Konstruktion der *B. subtilis* Deletionsmutanten $\Delta yhfL$

Die Deletion von *yhfL* wurde nach der gleichen Vorgehensweise durchgeführt, wie es bereits für die anderen Einfach-Mutanten beschrieben wurde (s. Abschnitt 6.6.2). Die Amplifikation der entsprechenden Segmente erfolgte mit den Primern PMW13, PMW14, PMW15 und PMW7. Die Herstellung der Kanamycin-Kassette wurde aus dem Vektor pDG783 mit den Primern 5'kan783 und 3'kan783 erhalten. Die anschließende Fusions-PCR zeigte sich erfolgreich. Allerdings konnte auch nach mehreren Transformationsversuchen keine Deletionsmutante erhalten werden (Daten nicht gezeigt).

6.6.4 Voruntersuchung auf Surfactin-Produktion mittels Hämolyse

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die generierten Deletionsmutanten grundsätzlich in der Lage waren Surfactin zu produzieren. Hierfür wurde die hämolytische Aktivität des Surfactins genutzt. Einen Tag zuvor wurden die Mutanten auf DSM-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz ausplattiert. Am nächsten Tag wurde jeweils eine Kolonie auf Blut-Agarplatten umplattiert und für

20 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Sollten die Mutanten nicht in der Lage sein Surfactin zu produzieren, so dürften sich auch keine Halos bilden. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abb. 6-8 (A) dargestellt.

Deutlich erkennbar ist die Ausbildung von Halos, damit waren alle Einfach-Mutanten weiterhin in der Lage Surfactin zu assemblieren.

6.7 Konstruktion von Mehrfachmutanten

Aus den Hämolyseversuchen konnte kein deutlicher Rückgang der Surfactin-Produktion nachgewiesen werden. Konsequenterweise sollten Mehrfach-Mutanten konstruiert werden. Da weiterhin nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die einzelnen Gene an der Initiationsreaktion beteiligt sein können. Hierzu wurde die chromosomale DNA der Mutanten MW1, MW2 und MW3 isoliert. Anschließend erfolgte die Amplifikation der entsprechenden Deletionsbereiche mit den gleichen Primern, die auch zur Analyse der der Einfachmutanten eingesetzt wurden. Die gereinigten Amplifikate dienten wiederum zur Transformation der Mutanten. Mit dieser Methode konnte auf die Fusions-PCR verzichtet werden. Die erhaltenen Transformanten wurden, wie bereits bei den Einfachmutanten beschrieben, durch Colony-PCR verifiziert.

Auf diesem Wege konnten folgende Mehrfach-Mutanten erhalten werden:

Doppelmutanten:

MW5: Deletion von *yngI* (Tetracyclin) und *lcfA* (MLS)

MW6: Deletion von *yngI* (Tetracyclin) und *yhfT* (Spectinomycin)

MW8: Deletion von *yhfT* (Spectinomycin) und *lcfA* (MLS)

Dreifachmutante:

MW11: Deletion von *yngI* (Tetracyclin), *yhfT* (Spectinomycin) und *lcfA* (MLS)

Zusammenfassend sind in Tabelle 6.2 die Ergebnisse aus allen Deletionsversuchen dargestellt.

Tab. 6-2. Die in dieser Arbeit generierten OKB105-Mutanten

Die in grau dargestellten Mutanten konnten in dieser Arbeit nicht erhalten werden, da *yhfl* nicht deletiert werden konnte.

Einfach-Mutante	Doppel-Mutante	Dreifach-Mutante	Vierfach-Mutante
<i>lcfA::mIs ΔlcfA</i> (MW2)	<i>ΔlcfA/ΔyngI</i> (MW5)	<i>ΔlcfA/ΔyhfT/ΔyngI</i> (MW11)	<i>ΔlcfA/ΔyhfT/ ΔyngI/Δyhfl</i> (MW14)
<i>yngI::tet</i> <i>ΔyngI</i> (MW1)	<i>ΔlcfA/ΔyhfT</i> (MW8)	<i>ΔlcfA/Δyhfl/ ΔyngI</i> (MW10)	
<i>yhfT::spc</i> <i>ΔyhfT</i> (MW3)	<i>ΔyngI/ΔyhfT</i> (MW6)	<i>Δyhfl/ΔyhfT/ ΔyngI</i> (MW12)	
<i>yhfl::kan</i> <i>Δyhfl</i> (MW4)	<i>ΔlcfA/Δyhfl</i> (MW9)	<i>ΔlcfA/ΔyhfT/ Δyhfl</i> (MW13)	
	<i>ΔyngI/Δyhfl</i> (MW7)		
	<i>ΔyhfT/Δyhfl</i> (MW15)		

Trotz nach mehrfacher Wiederholung dieser Transformationen, mit entsprechenden Positiv- und Negativkontrollen der Kompetenz und Integrität der verwendeten Stämme, wurde im Fall von *yhfl* keine Mutante erhalten. Aus diesem Grund konnten auch keine Mehrfachmutanten generiert werden, die eine Deletion des *yhfl*-Gens aufwiesen (grau markierter Text in der Tab. 6-2).

6.7.1 Voruntersuchungen zur Surfactin-Produktion mittels Hämolyse

Die Mehrfach-Mutanten wurden ebenfalls auf Surfactin-Produktion mittels Blut-Agar-Platten untersucht. Dabei wurde verfahren, wie bereits beschrieben (Abschnitt 6.6.4). Deutlich zu erkennen ist, dass die Halo-Bereiche der Dreifach-Mutante und damit die Hämolyse durch Surfactin stark vermindert ist (s. Abb. 6-8 B und C).

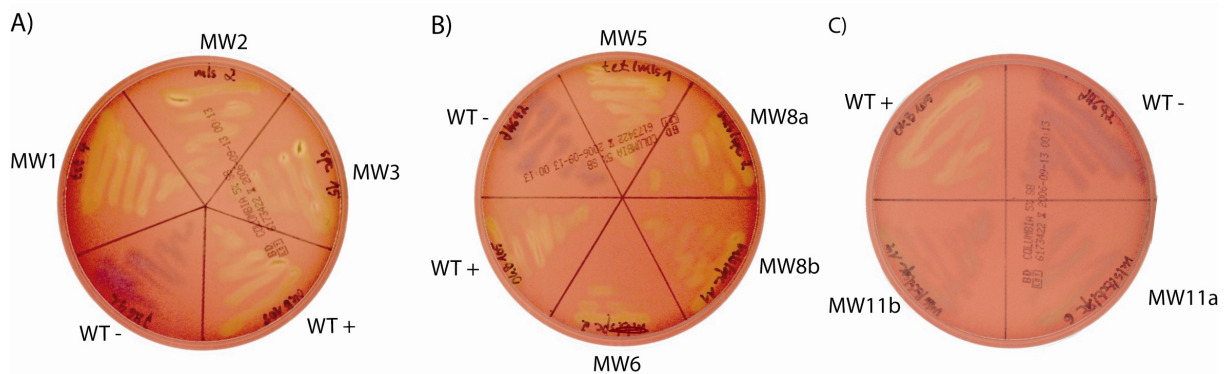


Abb. 6-8. Hämolyse-Untersuchung der generierten Mutanten mittels Blutagar.

Ausstrich der Mutanten und der Wildtypen *B. subtilis* OKB105 und JH642 auf Blutagar-Platten (LB-Agar mit 5% Kaninchenblut). Jeweils eine Bakterienkolonie wurde ausgestrichen und bei 37°C für 16 h inkubiert.

A) Hämolyse-Untersuchung der Einfach-Mutanten und der Wildtypen (WT). MW1 = $\Delta yngI$; MW2 = $\Delta lcfA$, MW3 = $\Delta yhfT$

B) Hämolyse-Untersuchung der Doppel-Mutanten und der Wildtypen (WT). MW5 = $\Delta lcfA/\Delta yngI$, MW6 = $\Delta yngI/\Delta yhfT$, MW8 = $\Delta lcfA/\Delta yhfT$ (MW8a und 8b)

C) Hämolyse-Untersuchung der Dreifach-Mutante und der Wildtypen (WT). MW11 = $\Delta lcfA/\Delta yhfT/\Delta yngI$ (MW11a und MW11b)

WT-: *B. subtilis* JH642 Wildtyp (aufgrund von Mutationen im *sfp*-Gen keine Produktion von Surfactin); WT+: *B. subtilis* OKB105 (Surfactin-Produzent)

6.7.2 HPLC-MS-analytische Untersuchung

Aus den Voruntersuchungen mittels Blut-Agar-Test zeigte insbesondere die Dreifach-Mutante MW11 keine Hämolyse. Um eine Aussage bezüglich der Quantität treffen zu können, wurde eine Analyse mittels HPLC-MS der Surfactin-Produktion aus den Kulturüberständen der *B. subtilis* Wildtypen OKB105 und JH642 und den generierten Mutanten durchgeführt.

Der Wildtyp OKB105 ist natürlicher Surfactin-Produzent und diente zum Vergleich der maximalen Produktion von Surfactin. Der Wildtyp JH642 hingegen kann auf natürliche Weise kein Surfactin produzieren und wurde daher als Negativ-Referenz eingesetzt. Die Butanol-Extrakte der verschiedenen Stämme wurden nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 1,5 entsprechend der in Abschnitt 4.5.4 (Methodenteil) angegeben Methode präpariert und mittels RP-HPLC analysiert. Die Präparation des Surfactins aus dem Überstand erfolgte in drei unabhängigen Versuchen. Die Ergebnisse sind in folgender Abbildung zu sehen:

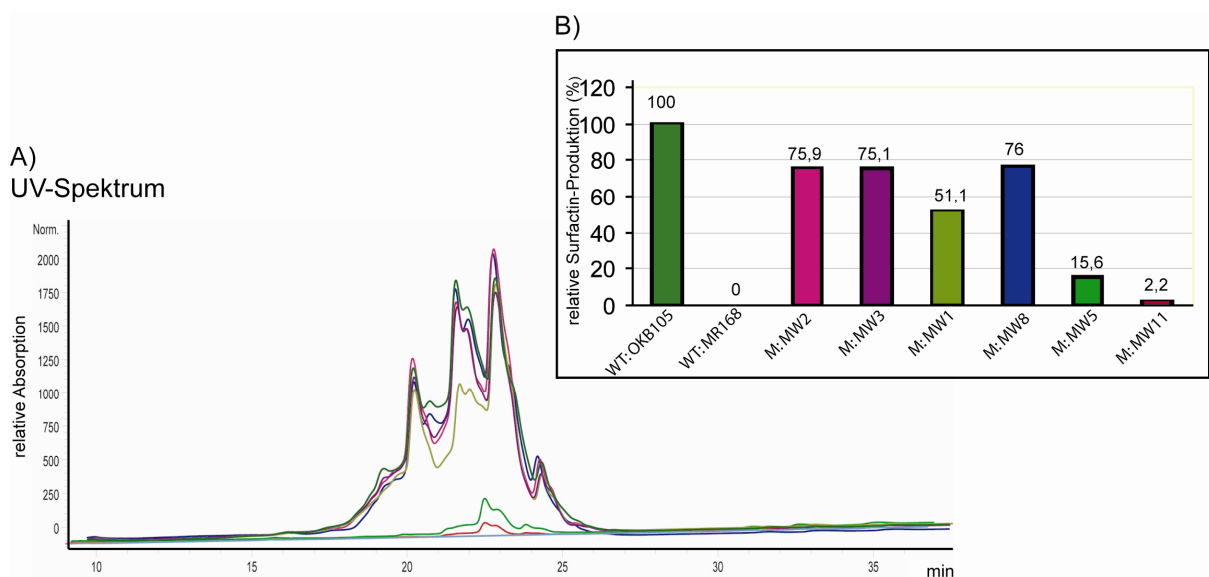


Abb. 6-9- Nachweis der Surfactin-Biosynthese der Mutanten mit Hilfe von HPLC-MS-Analytik

A) HPLC-MS-Analyse: Quantitativer Vergleich der Surfactin-Produktion der generierten Mutanten.

B) Prozentuale Berechnung der Surfactin-Produktion mit Hilfe der aus A) ermittelten Integrale der UV-Spektren. MW1 = $\Delta yngI$; MW2 = $\Delta lcfA$; MW3 = $\Delta yhfT$; MW5 = $\Delta lcfA/\Delta yngI$; MW8 = $\Delta lcfA/\Delta yhfT$; MW11 = $\Delta lcfA/\Delta yhfT/\Delta yngI$

HPLC-MS-Spektren wurden im Bereich von m/z-Werten zwischen 800 und 1300 aufgenommen. Diese sind in Abb. 6-9 dargestellt. Es wurden Signale bei m/z-Werten von 1045-1060 gemessen, die den Massen verschiedener Surfactin-Isoformen entsprechen. Die Surfactin-Produktions-Bestimmung im Fall der Mutante MW6 ($\Delta yngI/\Delta yhfT$) gelang nicht, da diese Mutante im verwendeten SPIII-Medium nicht kultiviert werden konnte.

In den Extrakten des Wildtyp-Stammes *B. subtilis* OKB105 konnten Lipopeptide nach 27,7 min (Retentionszeit der HPLC-Analyse) erhalten werden. Hierbei handelt es sich um die diversen natürlichen Surfactin-Derivate, welche leichte Variationen bezüglich der Länge der β -Hydroxy-Fettsäure (C13-C15-Derivate) aufweisen. Auch das erhaltene UV-Spektrum zeigt das typische Surfactin Aufspaltungsmuster. Die *sfp*-Mutante JH642 zeigt kein Surfactin Produktion und dient als Grundlinie. Um quantitative Aussagen treffen zu können, wurden die Integrale der entsprechenden Signale berechnet und diese durch die OD₆₀₀ der entsprechenden Mutanten geteilt. Somit wurde folgendes Surfactin-Produktions-Schema erhalten:

Eine um 25% verminderte Surfactin-Produktion im Vergleich zum Wildtyp OKB105 wurden für die Einfachmutanten MW1 und MW3 ermittelt. Besonders deutlich zeigt

die Mutante MW1 eine um die Hälfte verminderte Produktion. Die Doppelmutante MW5 zeigt einen um 85% verminderte und die Dreifachmutante eine um 98% verminderte Surfactin-Produktion.

Die Beobachtungen aus den Fettsäure-Aktivierungsexperimenten und der Surfactin-Produktion nach Deletion der entsprechenden Gene lassen folgende Schlussfolgerung zu: Die *in vitro* gezeigte Aktivierung der Fettsäure als CoA-Derivat vor allem durch LcfA und YhfL und der Rückgang der Surfactinbiosynthese in den entsprechenden Mutanten spricht ganz klar für eine Beteiligung der Enzyme an der Lipoinitiationsreaktion von Surfactin.

Weiterführende Untersuchungen zur Produktion von Surfactin der generierten Mutanten sowie der Generierung neuer Mutanten insbesondere der *yhfL*-Mutante, werden im Rahmen der Doktorarbeit von Femke Kraas^[197] durchgeführt.

7 Diskussion und Ausblick

Daptomycin und Surfactin gehören zur Klasse der zyklischen Lipopeptide, die durch NRPSs assembliert werden. Die biologische Aktivität dieser Lipopeptide ist sowohl vom Peptidrückgrad als auch von der Lipideinheit abhängig. Untersuchungen zur Acylierung von NRPS-Proteinen während der Initiationsreaktion sind im Gegensatz zur Elongations- (Aufbau des Peptidgerüsts) und Terminationsreaktion (Abspaltung des Produkts) hingegen wenig untersucht. Das Verständnis dieser Lipoinitiation ist jedoch eine Voraussetzung für die Entwicklung neuer Derivate und die damit mögliche Verbesserung der Bioaktivität solcher Verbindungen.^{[184][206][207]} Unter diesem Leitgedanken lassen sich auch die Ergebnisse dieser wissenschaftlichen Abhandlung verstehen und diskutieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die putative Acyl-CoA-Synthetase DptE des Daptomycin-Biosynthesecusters ein breites Spektrum von Fettsäuren als Substrate akzeptiert. Diese Fettsäuren werden als Adenylat aktiviert und auf das ACP DptF, welches ebenfalls in der Nähe des *dpt*-Operons lokalisiert ist, übertragen. Für diese Reaktion wurden auch die kinetischen Parameter bestimmt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass DptE eine hohe Präferenz gegenüber DptF aufweist.

In Bezug auf das erste Modul des Daptomycin-NRPS-Clusters, auf das vermutlich die DptF-gebundene Lipideinheit übertragen wird, konnte trotz verschiedener biochemischer Ansätze mit dem rekombinanten Protein keine Aktivität der C- und A-Domäne *in vitro* nachgewiesen werden. Damit bleibt dieser Biosyntheseschritt weiter ungeklärt.

Für Surfactin konnten vier potenzielle Kandidaten LcfA, YhfL, YngI und YhfT, welche möglicherweise an der Initiationsreaktion beteiligt sind, verifiziert werden. Auch ein Einfluss auf die Surfactin-Produktion durch Deletionsmutanten konnte nachgewiesen werden. Eine Deletion des Gens *yhfL* konnte trotz mehrerer Ansätze nicht erhalten werden. Daher können keine Aussagen über den Zusammenhang der Surfactin-Biosynthese in Bezug auf YhfL *in vivo* getroffen werden. Die Enzyme LcfA, YhfL und YhfT wurden biochemisch untersucht und zeigten, dass sie in der Lage waren Fettsäuren zu aktivieren. Für YngI hingegen konnte keine *in vitro* Aktivität

nachgewiesen werde. Daher kann in dieser Arbeit keine Aussage über die biochemische Aktivität von YngI getroffen werden.

7.1 Die Initiationsreaktion von Daptomycin

Im Fall von Daptomycin lässt die Organisation des Biosyntheseclusters vermuten, dass die diskreten Enzyme DptE (putative Acyl-CoA-Synthetase) und DptF (putatives ACP) an der Aktivierung und Übertragung der Fettsäure beteiligt sind (s. Abschnitt 2.7.2.4 der Einleitung). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigten, dass Dekansäure durch DptE in Gegenwart von ATP und Magnesiumionen in einem ersten Reaktionsschritt zum Adenylat konvertiert wird. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Übertragung des Acyl-Adenylats auf das kognate ACP DptF erfolgt. Daptomycin zählt zu der Klasse der aziden Lipopeptide. Vergleicht man die NRPS-Operons der aziden Lipopeptide fällt auf, dass sich in der näheren Umgebung dieser DNA-Sequenzen Gene befinden, deren Produkte ähnliche Homologien zu DptE und DptF aufweisen.^[109] Im Operon des NRPS-Biosynthesecluster von A54145 aus *S. fradiae* wurde ein fusioniertes Äquivalent *lptEF* identifiziert. Im Operon des NRPS-Biosynthesecluster von Friulimicin aus *A. friuliensis* wurden die Gene *lipA* und *lipD* identifiziert.^{[183][131] [120][208]} Daraus lässt sich ein allgemeiner Reaktionsablauf für azide Lipopeptide postulieren, der am Beispiel für Daptomycin in Abb. 7-1 dargestellt ist.

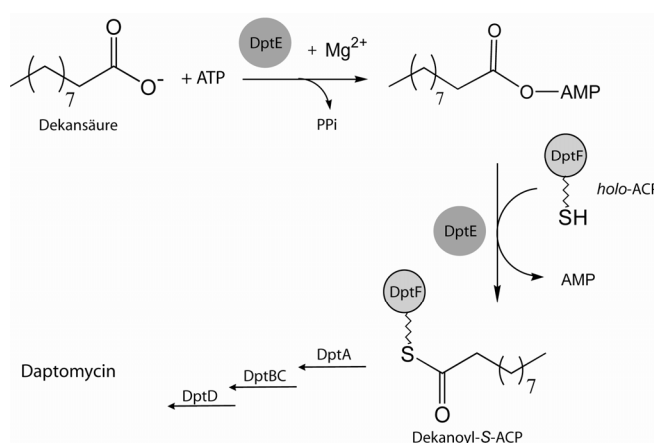


Abb. 7-4. Postulierter Lipidierungsmechanismus von Daptomycin

Die Acyl-CoA-Synthetase DptE katalysiert die Aktivierung der Fettsäure unter ATP-Verbrauch zum Adenylat. Anschließend wird diese Verbindung auf das *holo*-ACP DptF übertragen. DptF wiederum ermöglicht die Initiation der Daptomycin-Biosynthese.

7.1.2 Charakterisierung der Acyl-CoA-Synthetase DptE *in vitro*

Um die postulierte Lipoinitiationsreaktion von Daptomycin aufzuklären, wurden die Enzyme DptE und DptF kloniert, exprimiert und anschließend biochemische Untersuchungen durchgeführt. DptE und DptF konnten heterolog in *E. coli* als lösliche und aktive Proteine erhalten werden. In verschiedenen *in vitro* Experimenten wurde gezeigt, dass DptE eine Aktivierung der Dekansäure und Übertragung auf das DptF katalysiert. Weitere Untersuchungen zeigten, dass eine Aktivierung mittels CoA nicht erfolgte und dies auch keinen Einfluss auf die Reaktion hatte. Zusätzlich konnte durch ATP-PPi-Austauschreaktion gezeigt werden, dass die Reaktion über eine AMP-Spezies erfolgt und das vermutlich DptE DptF für seine Aktivität benötigt. Diese Befunde bestätigen die zuvor postulierte Initiationsreaktion von Daptomycin. Des Weiteren können aus diesen Untersuchungen Hinweise abgeleitet werden, dass es sich im Fall von DptE nicht wie anfangs vermutet um eine Acyl-CoA-Synthetase handelt, sondern um eine Acyl-ACP-Ligase. Diese Annahme liegt darin begründet, dass DptE den Transfer der aktivierten Fettsäure auf ein ACP und nicht auf CoA katalysiert. Acyl-ACP-Ligasen, wie z. B. CpPKS1 aus *C. Parvum*, katalysieren in einem ersten Schritt die Aktivierung des Substrates als Adenylat, reagieren dann aber nicht weiter mit CoA, sondern mit einem *holo*-ACP.^[209] Eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Enzymen ist nur schwierig möglich, da beide Enzymklassen mit dem 4'-Ppan-Rest entweder von CoA selbst, oder vom *holo*-ACP interagieren und daher das FACS-Motiv aufweisen (s. Abb. 7-2). Erst vor Kurzem hat Arora *et al.* die genannte Hypothese durch Untersuchungen in *Mycobacterium tuberculosis* bestätigt.^{[210][132]} In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die FAAL-Enzyme von PKS-Systemen möglicherweise eine zusätzliche Insertion aufweisen, die die Unterscheidung, ob das entsprechende Enzym mit CoA oder einem *holo*-ACP im weiteren Reaktionsverlauf reagiert, ermöglichen sollte. Dabei wurden Sequenzvergleiche mit potenziellen FAAL und FACS gemacht. Durch Struktur-Untersuchungen und Alignments von FadD28, ein FAAL-Ligase-Enzym aus *M. tuberculosis* H37Rv konnte eine 22 Aminosäure lange Sequenz (³⁴⁸ETVDFDTE³⁷⁷SLSAGHAKPCAGGGATSLISY³⁷⁷) identifiziert werden, die vermutlich an der Erkennung und Katalyse mit *holo*-ACPs verantwortlich ist.^[210] DptE wurde in dieser Arbeit als Acyl-ACP-Ligase identifiziert und gehört damit nach Einstufung von Arora *et al.* zur Klasse der FAAL-Enzyme. In DptE konnten die konservierten Reste des FACS-Motivs identifiziert werden (s. Abb. 8-3 im Anhang). Sequenzvergleiche

von DptE mit FadD28 aus *M. tuberculosis* ergaben eine 33%ige Übereinstimmung, jedoch konnte das von Arora *et al.* postulierte FAAL-Insertions-Motiv in DptE nicht identifiziert werden.

Wie die Ergebnisse der DptE vermittelten Fettsäureaktivierung und Übertragung auf das ACP zeigen, ist die Lipoinitiation durch DptE und DptF möglich. Dies wiederum steht im guten Einklang mit dem Verlust der Daptomycin-Produktion nach Deletion von DptE.^[208]

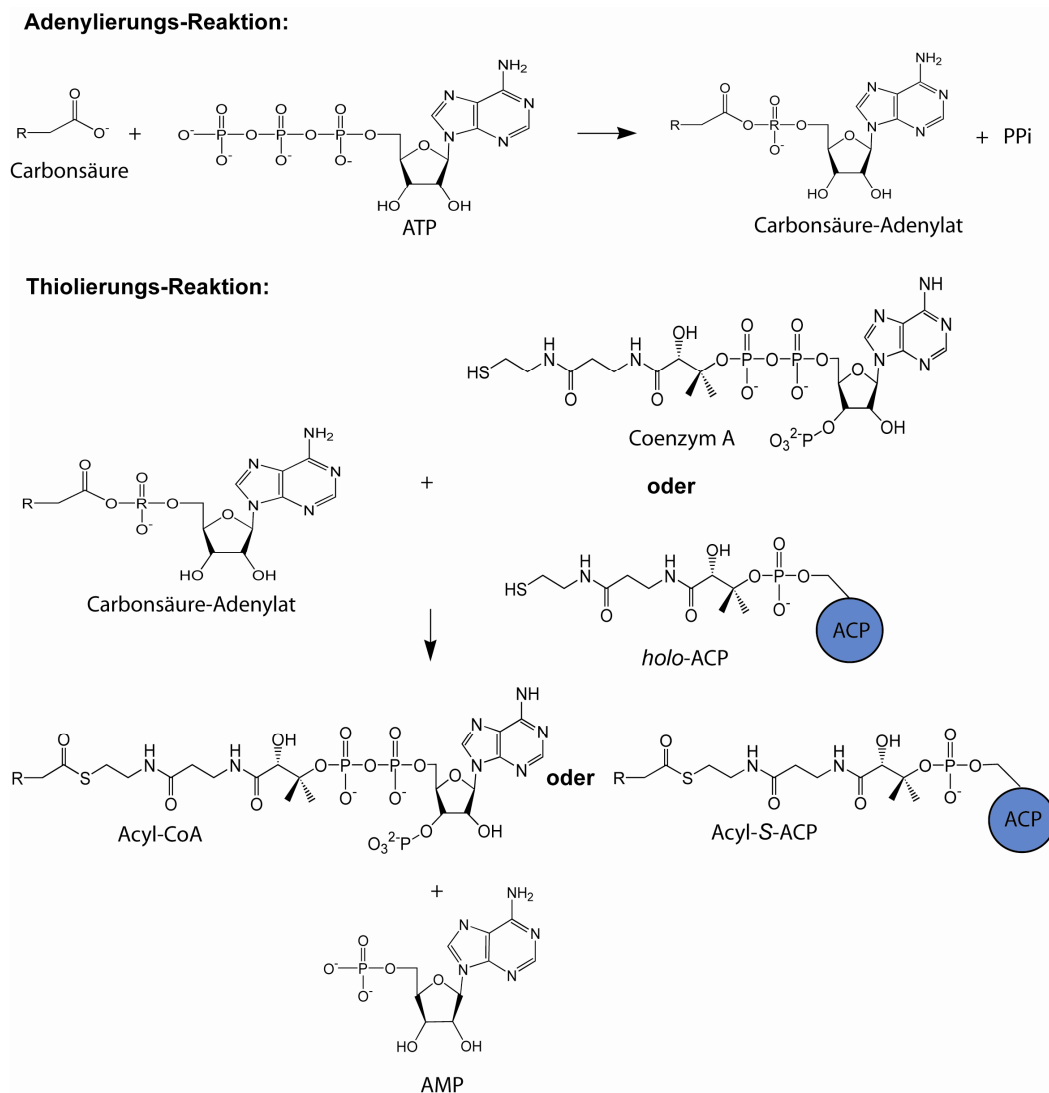


Abb. 7-2. Allgemeiner Fettsäureaktivierungs-Mechanismus von FACS (CoA) und FAAL (ACP)

Die Adenylat-bildenden Enzyme FACS und FAAL führen eine charakteristische Zweischrittreaktion durch. Im ersten Schritt (Adenylierungs-Reaktion) wird das Substrat nach Spaltung von ATP aktiviert. Dieser Reaktionsschritt ist in allen Enzymen dieser Klasse gleich. Im zweiten Schritt (Thiolierungs-Reaktion) erfolgt die Bildung eines Thioesters. FACS Enzyme reagieren in diesem Schritt mit Coenzym A zum Acyl-CoA-Thioester, wohingegen die FAAL-Enzyme entweder nur die erste Reaktion ausführen, oder die Übertragung der aktivierten Acyl-Komponente auf ein *holo*-ACP katalysieren.

7.1.3 Die Acyl-CoA-Synthetasen: Unspezifität führt zur Produktvielfalt

In dieser Arbeit wurde die Substratspezifität von DptE bestimmt. In ersten Untersuchungen wurde Dekansäure als Standard-Carbonsäure verwendet, da diese auch im natürlich assemblierten Daptomycin-Komplex auftritt und die kinetischen Daten ermittelt. Im weiteren Verlauf wurde zur Bestimmung der Substratspezifität von DptE Fettsäuren unterschiedlichster Art getestet und ebenfalls die kinetischen Daten bestimmt. Im Folgenden werden die erhaltenen kinetischen Parameter (s. Tabelle B im Abschnitt 5-8 im Ergebnisteil) diskutiert und mit den kinetischen Daten anderer Acyl-CoA-Synthetasen verglichen.

Bezüglich der kinetischen Parameter von DptE für die Fettsäure-Aktivierung von verschiedenen Carbonsäure-Substraten fällt auf, dass die K_M -Werte, und damit die Affinitäten zu den Substraten, die eine Kettenlänge von C10-C12-Kohlenstoffeinheiten (verzweigt und unverzweigt) besitzen, sehr gute Umsatzraten zeigten. Oktansäure, Tetradekansäure und β -Hydroxy-Carbonsäuren, welche nicht im natürlichen Daptomycin-Komplex vorkommen, stellten mit 2-13-fach höheren K_M -Werten weniger gute Substrate dar. Hexansäure, Palmitinsäure und 15-Methylhexadekansäure wiederum wurden nicht von DptE umgesetzt. Diese Daten zeigen, dass DptE eine hohe Substrattoleranz besitzt, diese aber begrenzt wird mit der Kettenlänge der Fettsäure. Kurzkettige (C6-C8), wie auch langkettige (C14-C20) Carbonsäuren sind keine bzw. schlechte Substrate von DptE.

Die beobachteten K_M -Werte von DptE und der Vergleich mit Werten aus der Literatur bekannten Systemen zeigen eine gute Übereinstimmung. Faap1 aus *S. cerevisiae* besitzt ebenfalls eine hohe Substratvarianz mit Präferenz zu Fettsäuresubstraten die eine Kettenlänge von C10-C18 aufweisen. Der K_M -Wert von Faa1p für Oleat beträgt 71.1 μM ^{[211][212]} und liegt damit in einer ähnlichen Größenordnung. Die CpPKS1-AL-Domäne aus *C. parvum*, welche an einer noch unbekannten PK-Synthese beteiligt ist, hat ebenfalls ein breites Substratspektrum mit Präferenz zu langkettigen Fettsäuren, insbesondere zur Archidonsäure.^[209] FadD13 ist eine FACS aus *M. tuberculosis*, die bevorzugt sehr langkettige Fettsäuren aktiviert. Hier konnte ein K_M -Wert von 19,79 μM für Palmitinsäure ermittelt werden.^[213] Abschließend ist festzuhalten, dass die hohe Substrattoleranz von DptE im guten Einklang mit den assemblierten NRPS-Produkten des *dpt*-Operons steht. Daptomycin wird in *S. roseosporus* nicht ausschließlich assembliert, sondern dieser Verbindungskomplex weist eine hohe Divergenz bezüglich der Fettsäurekomponente auf (s. Abb. 7-3).^[184]

Durch Substrattoleranz von DptE könnte gleichzeitig die strukturelle Vielfalt der assemblierten Produkte erhöht werden und würde damit eine Eigenschaft von NRPS-Produkten allgemein belegen. In anderen NRPS-Systemen, die azide Lipopeptide metabolisieren, ist dieser Trend ebenfalls erkennbar. Eine Ausnahme hingegen bildet CDA. CDA wurde ausschließlich mit einer trans-2,3-Epoxy-Hexansäure identifiziert (s. Abb. 7-3 und Abschnitt 2.7.1 der Einleitung).

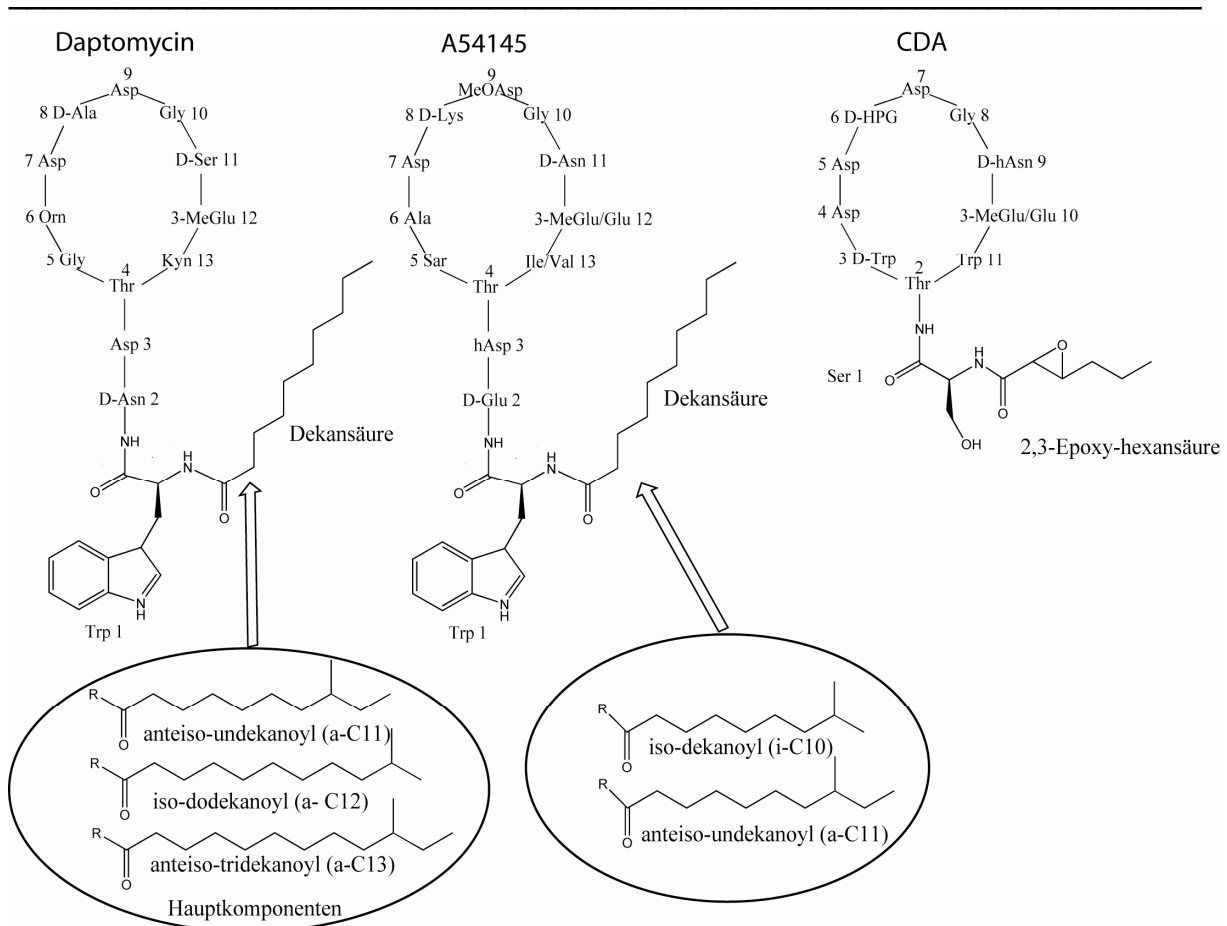


Abb. 7-3. Varianz der Fettsäurekomponente am Beispiel der aziden Lipopeptide

Dargestellt sind die chemischen Strukturen von drei Vertretern der aziden Lipopeptide und ihre natürlichen Fettsäure-Hauptkomponenten. Daptomycin aus *Streptomyces roseosporus* und A54145 aus *S. fradiae* werden natürlicherweise mit verschiedenen Fettsäure-Seitenketten produziert. CDA aus *S. coelicolor* wird ausschließlich mit der epoxidierten Hexansäure assembliert.

7.1.4 Die ACP-Spezifität von DptE

Im Gegensatz zur hohen Substrattoleranz bezüglich der Fettsäure konnte für das ACP eine höhere Spezifität nachgewiesen werden. DptE besitzt eine fünffach höhere katalytische Effizienz gegenüber DptF im Vergleich zu LipD aus *Actinoplanes friuliensis* und für AcpK aus *B. subtilis* konnte keine Aktivität festgestellt werden.

Auch die Affinität (K_M) zu dem entsprechenden Substrat spiegelt diesen Trend wieder. Das ACP LipD, das vermutlich an der Friulimicin-Biosynthese beteiligt ist^[214], stammt aus der Gattung der Actinomyceten und besitzt daher hohe genetische Ähnlichkeit zu DptF, wie z. B. ein hoher GC-Gehalt (ca. 70%). AcpK aus der Gattung *Bacillus* besitzt eine geringere genetische Ähnlichkeit. Dies könnte die unterschiedliche Akzeptanz gegenüber DptE erklären.

Der beobachtete K_M -Wert von 29,4 μM (s. Tabelle B in Abb. 5-8 im Ergebnisteil) für die Lipidierung von DptF durch DptE liegt in der gleichen Größenordnung verglichen mit anderen Enzymen, die eine ähnliche Reaktion katalysieren. Bei Faa1p aus *Saccharomyces cerevisiae* konnte ein K_M -Wert von 18,3 μM ermittelt werden.^[211] Im Beispiel von CpPKS1-AL wurde ein K_M -Wert von 3,53 μM identifiziert.^[209]

Aus den Ergebnissen der Transfer-Reaktion können Rückschlüsse auf spezifische Protein-Protein-Interaktion postuliert werden. Diese Aussage wird dadurch unterstützt, dass es sich bei DptE und DptF um diskrete Enzyme handelt, was auch im Fall für die Leinamycin-Biosynthese nachgewiesen werden konnte.^[215] Diese Interaktion wird ebenfalls für das ACP mit dem Initiationsmodul des CDA-NRPS-Systems postuliert, wie es weiter oben bereits beschrieben wurde. Zukünftige Interaktionsstudien z. B. durch Biacore™ könnten diese Vermutung bestätigen.

7.1.5 ATP-PPi-Austauschreaktion zur Aktivitäts- und Substratspezifitätsbestimmung von FACS und FAAL

Eine gängige und einfache Methode zur Untersuchung der Aktivität und Spezifität von A-Domänen ist der ATP-PPi-Austausch. Da A-Domänen zu der Familie der Adenylat-bildenden Enzyme gehören und die Acyl-CoA-Synthetasen, Acyl-AMP-Ligasen und Acyl-ACP-Ligasen ebenfalls zu dieser Klasse gehören, wurde vermutet, dass ein Aktivitäts-Nachweis mittels dieser Methode möglich ist. Im Fall von DptE konnte allerdings keine Reaktion festgestellt werden. Dies liegt vermutlich daran, dass die FACS-Enzyme einen sog. „Bi-Uni-Uni-Bi-Ping-Pong-Mechanismus“ besitzen. Dieser Mechanismus verläuft wie folgt: Die Substrate ATP und Carbonsäure wandern in die aktive Tasche des Enzyms und werden dort zum Acyl-AMP-Zwischenprodukt modifiziert. Die Reaktion erfolgt durch den nukleophilen Angriff des negativ geladenen Sauerstoffs der Carboxyl-Gruppe an die α -ständige Phosphatgruppe des ATPs. Anschließend wird anorganisches Pyrophosphat

freigesetzt und das CoA-Substrat tritt in die aktive Tasche ein und reagiert mit dem Acyl-Adenylat zum Carbonsäure-Thioester. Während dessen verweilt das Acyl-Adenylat in der aktiven Tasche.^[216] Das Produkt und das AMP verlassen anschließend gleichzeitig die aktive Tasche des Enzyms.

Ein Nachweis der Andenylat-Spezie mittels ATP-Pi-Austausch basiert darauf, dass die Adenylierungsreaktion reversibel ist. Durch die Rückreaktion, also die Regenerierung von ATP aus AMP und Pi, wird radioaktiv-markiertes Pi integriert, was letztendlich detektiert wird. Vermutlich ist dieser Schritt bei lankettigen-Acyl-CoA-Synthetasen extrem langsam, oder die Reaktion ist nicht reversibel, sodass diese Methode zu keinen Aussagen führte. In einem HPLC-MS-Assay zur Fettsäureaktivierung konnte allerdings die Notwendigkeit von ATP für die Fettsäurereaktion bestätigt werden. Denn wenn ATP in dem Reaktionsgemisch fehlte, konnte keine Aktivierung der Fettsäure detektiert werden.

In einem weiteren Versuch wurde die ATP-Pi-Austauschreaktion für DptE modifiziert, d. h. dem Reaktionsansatz wurde *apo*-DptF zugegeben. *Apo*-DptF ist wegen des fehlenden 4'-Ppan-Kofaktors inaktiv und eine Übertragung der Fettsäure-Spezies ist nicht möglich. Dabei zeigte DptE eine 100-fach höhere Aktivität in Gegenwart von *apo*-DptF, als ohne ACP (s. Abb. 5-6 im Ergebnisteil I). Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass DptE DptF für seine Aktivität bezüglich des ersten Reaktionsschritts (Adenylierungsreaktion) benötigt, was wiederum den postulierten "Bi-Uni-Uni-Ping-Pong-Mechanismus" belegt.

7.1.6 Funktion der C-Domäne – Beteiligung an der Initiation

Ein hervorzuhebendes Merkmal Lipopeptid-produzierender NRPS-Systeme ist das Vorhandensein einer C-Domäne am N-terminalen Ende des ersten Moduls. Die so bezeichnete Starter-C-Domäne erhält damit eine besondere Bedeutung.

Um zu klären welche Bedeutung diese C-Domäne hat, sollte das erste Modul (C-A-PCP) von Daptomycin kloniert, exprimiert und biochemisch untersucht werden. Dies gestaltete sich zunächst schwierig. Trotz der Optimierung der DNA-Sequenz auf *E. coli* konnte das Protein nur in Form von *Inclusion-Bodies* gewonnen werden. Erst die Expression des Proteins bei niedrigen Temperaturen um 10°C in einem speziellen *E. coli* Stamm (ArcticExpress™) und die Fusionierung eines N-terminalen GST-tags konnte das Enzym teilweise in löslicher Form erhalten werden. Erste

Aktivitätsuntersuchungen durch die Beladung der PCP-Domäne mit Fluoresceinyl-CoA, bestätigten zumindest die Aktivität der PCP-Domäne. Weitere Untersuchungen fielen jedoch negativ aus. Es konnte aus den verwendeten Methoden keine katalytische Aktivität der C- und A-Domäne abgeleitet werden. Die Koexpression von Chaperonen in *E. coli* ist in den 90er Jahren entwickelt worden.^{[198][217][218]} und aufgrund seiner zahlreichen Vorzüge ein durchaus wertvolles Instrument zur Expression schwer zugänglicher Proteine. Der verwendete *E. coli* Stamm ArcticExpress™ ermöglicht zum einen die Expression bei sehr niedrigen Temperaturen, zum anderen werden gleichzeitig Chaperone exprimiert, die auch bei niedrigen Temperaturen aktiv sind. Dies und auch der GST-tag hatten vermutlich einen positiven Einfluss auf das Löslichkeitsverhalten des Enzyms, sodass ein Teil inaktives Protein in der löslichen Phase wiedergefunden werden konnte.

Eine mögliche Ursache für die Inaktivität könnte daran liegen, dass sich die Chaperone während der Isolation nicht vollständig vom Enzym lösten und damit die Aktivität negativ beeinflussten. Denkbar ist auch, dass sich das Zielprotein nur durch den GST-tag in der löslichen Phase befand, aber eine mögliche Fehlfaltung, die zu *Inclusion-Bodies* führte, weiter bestand.

Die Verwendung des heterologen Wirtes *E. coli* für die rekombinante Produktion von NRPS-Systemen aus Actinomyceten kann zu Problem führen. Es wurde häufig beobachtet, dass die heterologe Produktion von einzelnen Modulen oder Domänen in *E. coli* zu unlöslichen und inaktiven Proteinen führen kann. Vermutlich ist diese Problematik durch unzureichende Faltung des heterolog produzierten Enzyms im Wirt *E. coli* zurückzuführen. Um eine biochemische Charakterisierung dieser Systeme zu ermöglichen, könnte eine Expression dieser Gene in verwandten Wirten wie *Streptomyces lividans*, *Neurospora crassa* und *Aspergillus niger* helfen.^{[219][220]} Angesichts der fehlenden Aktivität von DptA-M1 war eine direkte Beurteilung der Übertragungsreaktion nicht möglich. Trotzdem soll im Folgenden die mögliche Funktion der Starter C-Domäne diskutiert werden.

Eine phylogenetische Verwandtschaftsuntersuchung von Kondensationsdomänen zeigte, dass Starter-C-Domänen einen gesonderten Zweig aufweisen. Homologie-Vergleiche mit C-Domänen aus Elongationsmodulen bestätigten zusätzlich diese Ergebnisse durch eine geringe Sequenzähnlichkeit zueinander.^{[65][221]}

Daher wird postuliert, dass die C-Domäne ähnlich wie eine Acyltransferase agiert und die Kondensationsreaktion zwischen einem CoA-Derivat oder einer ACP-gebundene Fettsäure und einer Aminosäure katalysiert. Für Daptomycin wird folgendes Modell angenommen (s. Abb. 7-4):

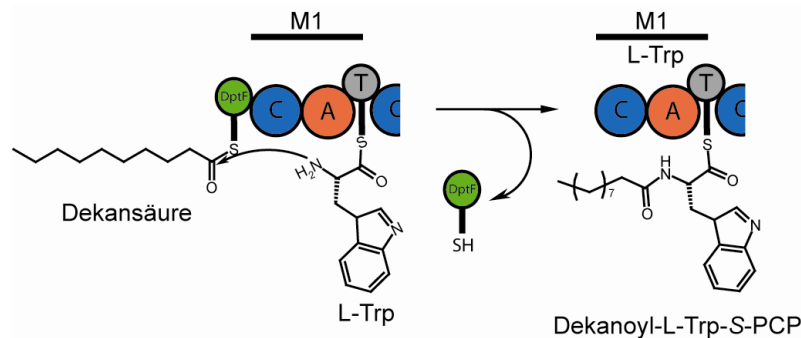


Abb. 7-4. Modell der Lipoinitiationsreaktion von Daptomycin

Das mit der Fettsäure beladenen DptF interagiert durch Protein-Protein-Wechselwirkung mit der C-Domäne des ersten Moduls von DptA-M1. Dadurch kommt es zur Bindungsknüpfung zwischen L-Tryptophan und der Acyl-Komponente katalysiert durch die C-Domäne, die ähnlich einer Acyl-Transferase agiert. Anschließend wird das ACP DptF freigesetzt und die Daptomycin wird durch weitere NRPS-abhängige Katalyseschritte synthetisiert.

Die C-Domäne besitzt zwei Untereinheiten. Die Donor-(D)-Seite ist für die Bildung des Elektrophils (die Einheit des vorangegangenen Moduls) und die Akzeptor-(A)-Seite die das Nukleophil koordiniert (Substrat des eigenen Moduls).^[62] Es konnte gezeigt werden, dass die D-Seite von C-Domänen in Elongationsmodulen eine geringere Substratspezifität aufweist als die A-Seite.^[222] In Starter-C-Domänen hingegen wird angenommen, dass die D-Seite eine höhere Substratspezifität aufweist. Die Hypothese, dass die Starter-C-Domäne für die Selektion der Fettsäurekomponente verantwortlich ist, wird dadurch unterstützt, dass die Biosynthese von Daptomycin in dem artfremden Organismus *S. lividans* ausschließlich mit Fettsäuren des natürlichen Daptomycin-Komplexes erfolgt und nicht mit Fettsäuren, die aus dem Wirtsorganismus stammen.^[223] Weiter wird die Hypothese unterstützt, dass DptE *in vitro* eine enorme Reihe von Fettsäuren auf DptF überträgt, die noch nicht im natürlich assemblierten Komplex identifiziert wurden, wie z. B. hydroxylierte und ungesättigte Fettsäuren. Jedoch konnten Untersuchungen zu den Enzymen der CDA-Biosynthese (HxcO und HcmO) nicht genau belegen, welches der beiden Enzyme letztendlich die Epoxidierung der Fettsäure ausführt, da auch die Konfiguration der Epoxy-Gruppe im CDA-Molekül

selbst noch nicht bekannt ist. Bekannt ist jedoch, dass HxcO die Epoxy-Gruppe mit der (2R,3S)- und HcmO mit der (2S,3R)-Konfiguration katalysiert.^[115] Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass trotz der Deletion von *hxcO*, die CDA-Biosynthese nicht ausbleibt, sondern die n-Hexansäure in das CDA-Molekül integriert wird.^[113] Hingegen konnte ein Abbruch der CDA-Biosynthese verzeichnet werden, wenn *hcmO* deletiert wurde, was wiederum für eine Spezifität der Starter-C-Domäne sprechen würde.^[113]

7.2 Die Lipoinitiationsreaktion von Surfactin

7.2.1 Model der Lipoinitiationsreaktion von Surfactin

Für die Lipoinitiationsreaktion von Surfactin sind drei mögliche Aktivierungs- und Übertragungs-Modelle der Surfactin-Acylierung vorstellbar. Das erste Modell auf der diese vorliegende Arbeit aufbaut ist, dass es eine FACS gibt, die die Carbonsäure als CoA-Thioester aktiviert und auf das erste Glutamat-aktivierende Modul von SrfA-A überträgt. Dieser Vorgang leitet dann die Surfactin-Biosynthese ein (s. Abb. 7-5 A). Dieser Mechanismus wird favorisiert. Dies liegt darin begründet, dass in vielen PKS oder PKS/NRPS-hybriden Systemen eine N-terminale AL-Domäne (Acyltransferase) fusioniert mit einem ACP (AL-ACP) gefunden wurde. Diese AL-Domäne wiederum überträgt Fettsäure-CoA-Derivate auf das kognate ACP.^[224-227] Die zweite vorstellbare Aktivierungs-Reaktion könnte sein, dass eine Acyl-ACP-Ligase ein noch unbekanntes ACP mit der entsprechenden Fettsäure modifiziert, wie dies z. B. bei Daptomycin in dieser Arbeit gezeigt wurde (s. Abb. 7-5 B). Eine dritte Möglichkeit könnte sein, dass am Initiationsprozess zusätzlich zu den postulierten FACS noch eine Acyltransferase involviert ist. Diese Acyltransferase könnte das CoA-aktivierte oder auch ACP-gebundene Substrat auf das Glutamat-aktivierende Modul übertragen und dann die Initiation vorantreiben (s. Abb. 7-5 C). Acyltransferasen katalysieren den Transfer von Acyl-Einheiten (Coenzym A oder ACP-gebunden) auf Peptide oder Proteine. Eine solche Acyltransferase wurde bereits in der Literatur diskutiert. Dabei handelt es sich vermutlich um ein ca. 40 kDa großes Protein.^{[141][142]} In welcher Art und Weise dieses Protein an der Synthese beteiligt sein könnte, konnte bislang noch nicht geklärt werden.

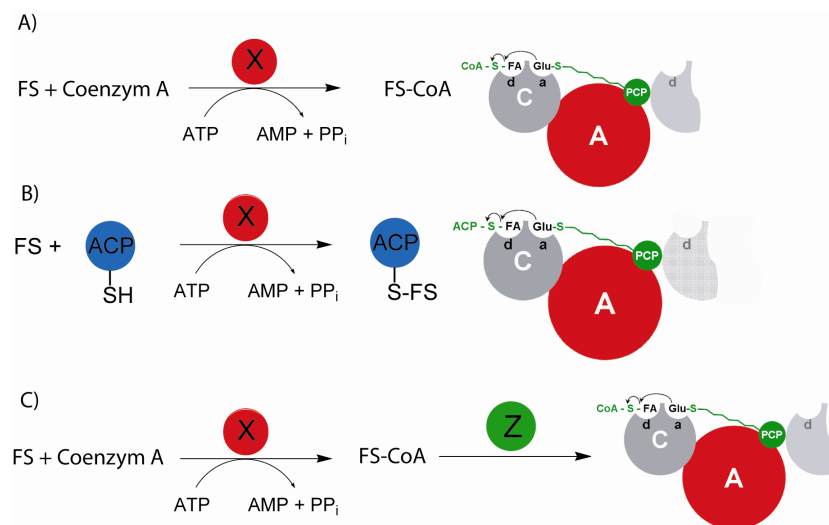


Abb.7.5: Postulierte Lipoinitiationsreaktionen von Surfactin

Für die Lipoinitiationsreaktion sind prinzipielle drei Reaktionen vorstellbar.

A) Die Fettsäure-Komponente wird durch eine unbekannte Acyl-CoA-Synthetase (X) in einem zweistufigen Prozess als CoA-Thioester aktiviert. Die C-Domäne von SrfA-M1 katalysiert anschließend die Bindungsknüpfung. Damit wird die Assemblierung von Surfactin eingeleitet ohne dass ein weiteres *in trans* agierendes Enzym beteiligt ist.

B) Die Fettsäure-Komponente wird ebenfalls wie in A aktiviert, jedoch erfolgte die Übertragung auf ein *holo*-ACP. Dieses wiederum interagiert mit dem ersten Modul und es kommt zur Einleitung der Surfactin-Biosynthese.

C) Eine Acyl-CoA-Synthetase aktiviert die Fettsäure als CoA-Thioester, jedoch erfolgt nicht die unmittelbare Übertragung der Komponente auf das erste Modul, sondern eine Acyltransferase (Z) katalysiert diesen Reaktionsschritt. Denkbar ist auch, dass die Fettsäure zuvor auf ein ACP transferiert wird, und dann durch die Aktion von Z die die Surfactin-Biosynthese eingeleitet wird.

7.2.2 Die Suche nach beteiligten Enzymen der Lipidierungsreaktion

Im Fall von Surfactin gestaltete sich die Suche nach geeigneten Kandidaten im Gegensatz zum Daptomycin-Projekt schwieriger, denn aus dem *srf*-Operon ließen sich keine Rückschlüsse auf die Initiierung erhalten. Durch Untersuchungen in *Mycobacterium tuberculosis* konnte gezeigt werden, dass PKS-Systeme mit FAS interagieren können. FAAL und FACS liefern so die Starter-Moleküle für PKS-Systeme.^{[204][228][203]} Daher galt die Suche nach geeigneten Kandidaten basierend auf AMP-Ligasen, die *in trans*, vergleichbar mit FenF (Acyltransferase) der Mycosubtilin-Biosynthese, das erste Modul mit der entsprechenden Fettsäure bedienen. Am Beispiel von Mycosubtilin ist hervorzuheben, dass die Myristinsäure von einer N-terminal fusionierten AL-Domäne (AL1; Acyltransferase) als AMP-Derivat auf ein ebenfalls fusioniertes ACP (ACP1) übertragen wird (s. Abschnitt 2.7.1 der Einleitung).

Da kein Acyl-Carrier-Protein innerhalb des Surfactin-Genclusters verifiziert werden konnte und zudem aus vergangenen Studien bereits bekannt war, dass die Starter-C-Domäne des ersten Moduls von Surfactin β -Hydroxy-myristinoyl-CoA als Substrat akzeptiert, fokussierte sich die Suche auf Fettsäure-CoA-Synthetasen (FACS). Durch Homologievergleiche konnten vier potenzielle Enzyme identifiziert werden: LcfA, YhfL, Yngl und YhfT, alle eingestuft als FACS, da sie sowohl typische AMP- und FACS-Motive aufwiesen (s. Abb. 8-7 und 8-8 im Anhang). Die vier potenziellen Kandidaten liegen im Genom von *B. subtilis* verteilt vor (s. Abb. 7-6). Interessant ist, dass das Gen *yngl*, in der Nähe des Plipastatin-Clusters (*pps*) lokalisiert ist. Der *pps*-Gencluster codiert für NRPSs zur Assemblierung von Plipastatin, ein weiteres zyklisches Lipopeptid mit hohen Ähnlichkeiten zu Fengycin. Daher liegt die Vermutung nahe, dass Yngl möglicherweise den PPS-NRPS-Cluster und den Surfactin-Cluster bedient. Für AcpP aus *E. coli* K-12 ist so ein ähnliches Verhalten nachgewiesen worden. AcpP ist das einzige ACP in diesem Stamm und bedient daher nicht nur FAS-Systeme, sondern ist auch am Transfer von Acyl-Einheiten während der Phospholipid-, Lipid A- oder Haemolysin-Biosynthese beteiligt.^[193]

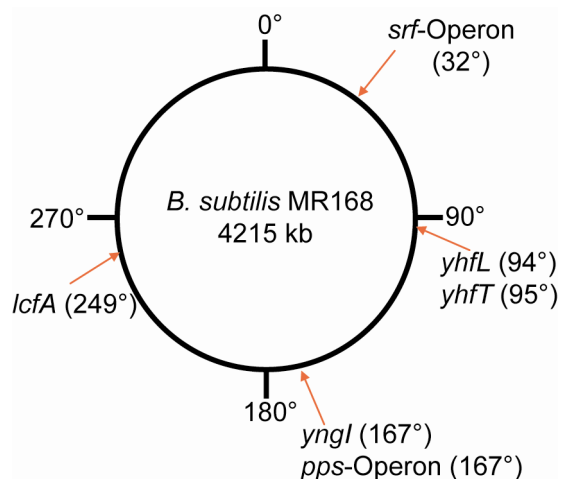


Abb. 7-6. Verteilung der postulierten Acyl-CoA-Synthetasen im Genom von *B. subtilis*

Lage der putativen Acyl-CoA-Synthetasen und die bekannten NRPS-Gencluster von Surfactin (*srf*) und Plipastatin (*pps*) in *B. subtilis* MR168 wie im Genomprojekt annotiert.

7.2.3 Charakterisierung der FACS-Enzyme aus *B. subtilis*

Zur Aufklärung welches der postulierten Enzyme aus Abschnitt 7.2 die Stimulierung der *in vitro* Surfactin-Biosynthese hervorruft, sollte zuerst untersucht werden. Dazu wurden die Gene *lcfA*, *yhfL*, *yngl* kloniert und exprimiert. YhfT wurde im Rahmen der

Diplomarbeit von Femke Kraas kloniert, exprimiert und untersucht.^[197] Alle Enzyme konnten in einer löslichen Form erhalten werden. Biochemische Fettsäure-Aktivierungs-Assays zeigten, dass die isolierten Enzyme LcfA und YhfL aus *B. subtilis* OKB105 als Mitglieder der Acyl-CoA-Synthetase-Familie klassifiziert werden können. LcfA und YhfL waren in der Lage β -Hydroxy-myristinsäure, eine Fettsäure die auch im natürlichen Komplex von Surfactin vorkommt, als CoA-Thioester zu aktivieren.

Die Enzymen LcfA und YhfL sind in der Literatur bereits beschrieben. Ihnen wird eine mögliche Funktion in der β -Oxidation zugeschrieben.^[229] Diese Möglichkeit kann nicht ausgeschlossen werden, da die β -Oxidation ebenfalls durch CoA-Spezies erfolgt. Allerdings stellt sich die Frage, ob die entsprechende Carbonsäure unmittelbar nach der Aktivierung als CoA-Thioester in die Surfactin-Biosynthese eintritt, oder ob die CoA-Spezies erst nach weiteren modifizierenden Schritten der β -Oxidation in die Surfactin-Initiationsreaktion einfließt. Rückschlüsse könnten aus der Konfiguration der β -Hydroxy-Gruppe der Fettsäure gezogen werden. Die in Surfactin vorkommende Fettsäure weist eine R-konfigurierte β -Hydroxylierung auf, was im Widerspruch mit der S-3-Hydroxy-Funktion der Degradationsprodukte aus der β -Oxidation steht.^[68] Die Fettsäurebiosynthese wiederum führt eine β -Hydroxy-Funktion ein, die hingegen die spezielle R-Konfiguration aufweist. Eine andere Möglichkeit könnte jedoch sein, dass die β -Hydroxyfunktion der Surfactin-Acyl-Einheit durch ein zusätzliches *trans*-ständiges Enzym eingeführt wird. Ein Kandidat könnte hier CypC aus *B. subtilis* MR168 darstellen. CypC ist eine P450 Monooxygenase, und katalysiert die R-3-Hydroxylierung von Myristinsäure in Gegenwart von H₂O₂.^[230]

7.2.3.1 Aktivitätsuntersuchungen der putativen FACS YngI

In der vorliegenden Arbeit gelang es nicht eine Aktivität von YngI nachzuweisen. Es konnte weder gezeigt werden, dass YngI β -Hydroxy-myristinsäure noch Dekansäure umsetzt. Auch eine Übertragung auf ein Acyl-Carrier-Protein, als Beispiel wurde AcpK aus *B. subtilis* gewählt, konnte nicht belegt werden. *YngI* ist in der Nähe des 3'-Endes des ORFs von Plipastatin lokalisiert (s. Abb. 7-6). Plipastatin aus *B. subtilis* sp. MR168 ist vergleichbar mit Fengycin aus *B. subtilis* sp. F29-3. Auch im *fen*-Operon (Fengycin) sind am 3'-Ende vergleichbare ORFs zu finden. *YngI* wird dort als *fenL* bezeichnet. Insgesamt handelt es sich um sechs ORFs, die vermutlich an der

Fettsäure-Biosynthese von Fengycin bzw. Plipastatin beteiligt sind.^[231] Die Lipopeptide Fengycin und Plipastatin unterscheiden sich im Vergleich zu Surfactin zum einen in der Länge der Fettsäure-Komponente. Surfactin weist eine um zwei Kohlenstoffeinheiten kürzere Fettsäure auf. Zum anderen sind die Surfactin-Acyl-Reste im assemblierten Komplex vorwiegend verzweigt.

Eine weitere Möglichkeit könnte sein, dass YngI u.a. an der Biosynthese der Fettsäure beteiligt ist. Jedoch konnte auch im *yngI*-Operon kein ACP identifiziert werden, an dem die Synthese der Fettsäurekomponente erfolgen könnte. Denkbar wäre daher, dass es eine Interaktion des Sekundärmetabolismus mit dem Primärmetabolismus gibt, wie es im Fall von CDA bereits beschrieben wurde. Ein weiteres Beispiel stammt aus dem PKS-assemblierten Aflatoxin aus *Asparagillus parasiticus*. Bei dem die Enzyme HexA und HexB Hexansäure zur PKS-Initiation aus Acetyl-CoA und Malonyl-CoA-Einheiten synthetisieren.^{[232][233]}

YngI wurde als Thioredoxin-Fusionsprotein exprimiert. Thioredoxin hat ein molekulares Gewicht von 12 kDa und ist dazu gedacht, zum einen die Expressionsrate und zum anderen die Löslichkeit positiv zu beeinflussen. Das pBAD-Vektorsystem, welches Thioredoxin an das Zielprotein fusioniert, wurde nur verwendet, weil die Integration des Gens in das pQE60-Vektorsystem, welches anfänglich zur Klonierung eingesetzt wurde, nicht gelang. Eine Inaktivität von YngI könnte darin begründet liegen, dass Thioredoxin die Aktivität von YngI negativ beeinflusst, sodass daher keine Aktivität messbar war. Zukünftige Untersuchungen sollten, um einen Einfluß von Thioredoxin auf die Aktivität von YngI ausschließen zu können, daher ohne Fusions-Protein erfolgen. Dies könnte dadurch realisiert werden, dass das Thioredoxin mittels Enterokinase abgespalten wird, oder *yngI* in ein neues Vektorsystem integriert wird.

7.2.3.2 Aktivitätsuntersuchungen der putativen FACS YhfT

Die putative Acyl-CoA-Synthetase YhfT wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Femke Kraas kloniert, isoliert und biochemisch untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass YhfT in der Lage war, β -Hydroxy-myristinsäure als AMP-Derivat zu aktivieren. Eine Übertragung auf das Coenzym A konnte nicht festgestellt werden.^[197] YhfT könnte daher als FAAL eingestuft werden wie es bereits Arora *et al.* für einige postulierte FACS kürzlich beschrieb.^[210] Eine vermutete FAAL-Insertionssequenz

konnte allerdings für YhfT nicht festgestellt werden (s. Abschnitt 7.1.2). Homologie-Vergleiche hingegen zeigten, dass in der Proteinsequenz des FACS-Motivs von YhfT wichtige Aminosäuren fehlen. FACSs besitzen zwei wichtige Bindungsmotive. Das ATP-AMP-Bindungsmotiv ist konserviert unter der ATP-AMP-Bindungs-Protein-Familie. Dazu zählen A-Domänen, Luziferasen und AMP-Ligasen. Folgende hoch konservierte Sequenzen weisen diese Adenylat bildenden Enzyme auf: YTS GTTGX PKGV und GYGXTE. Eine weitere wichtige und konservierte Aminosäure-Sequenz, die insbesondere bei FACS auftritt, ist das FACS-Motiv, welches sowohl für die Substratspezifität als auch für die Katalyse verantwortlich ist. Dieses Motiv enthält zwei invariante Glycin-Reste an Position 2 und 7 und einen hoch konservierten Glycin Rest an Position 16. Weitere invariante Reste finden sich an Pos 3 (Trp), Pos 6 (Thr), Pos 8 (Asp), Pos 22 (Asp), Pos 23 (Arg) und Pos 25 (Lys).^[234] Ein Sequenzvergleich ist in Abb. 7-7 zu sehen.

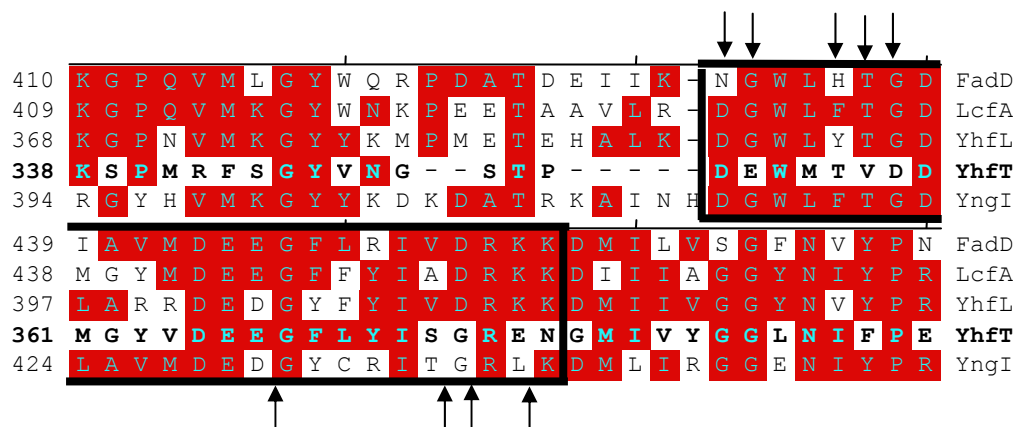


Abb. 7-7. ClustalW-Alignment von YhfT

Gezeigt ist ein Sequenz-Alignment von YhfT, den anderen putativen Enzymen LcfA, YhfL und YngI aus *B. subtilis* und FadD aus *E. coli*. Dargestellt ist das FACS-Motiv (schwarzer Kasten). Indiziert durch Pfeile sind die hoch konservierten Aminosäure-Reste, die Bestandteil des FACS-Motivs sind, aber für YhfT abweichen.

Auffällig ist, dass bei YhfT sechs der acht invarianten Reste des FACS-Motivs fehlen (Positionen 2, 3, 6, 7, 22 und 25, dargestellt in Abb. 7.3 mit Pfeilen). Weiter ist zu bemerken, dass YhfT zu den anderen FACS-Proteinen die geringste Homologie aufweist. Auch mit dem Vergleich von FadD28 aus *M. tuberculosis*, welches als FAAL-Protein identifiziert wurde, zeigte nur eine geringe Identität von 20%.^[210] In der Literatur wurde für YhfT eine Beteiligung in frühen Schritten der Biotin-Biosynthese postuliert. Diese Spekulation basiert darauf, dass *yhfT* mit *bioY* assoziiert vorkommt.

BioY ist ein Mitglied des BirA Regulator-Enzyms, das wiederum das *yhfT/S*-Operon reguliert. BirA ist ein ubiquitär vorkommender Biotin-Biosynthese Repressor.^[235]

Zukünftige Untersuchungen bezüglich einer Übertragungsreaktion auf ein ACP, vergleichbar mit DptE, könnten weitere Aufschlüsse zur Aktivität und Spezifität von YhfT liefern.

7.2.4 ATP-PPI-Austauschreaktion zur ATP-Abhängigkeitsbestimmung

Im Fall von YhfL konnten im Fettsäureaktivierungs-Assay mit Dekansäure geringen Mengen Dekanoyl-AMP mittels HPLC-MS detektiert werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Detektion des AMP-Zwischenprodukts für Acyl-CoA-Synthetasen die entweder kurzkettige- oder mittelkettige-Carbonsäuren als Substrate akzeptieren möglich ist, im Gegensatz zu den langkettigen-FACS.^{[236][237][238]} Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass das Zwischenprodukt der YhfL-vermittelten Fettsäureaktivierung einerseits nur für die Dekansäure detektiert werden konnte und andererseits nur in sehr geringen Ausbeuten erhalten wurde. Für LcfA konnte indirekt nachgewiesen werden, dass die Reaktion über eine Adenylat-Zwischenstufe verläuft. Fehlte im Fettsäureaktivierungs-Assay ATP, konnte keine Produktbildung detektiert werden.

7.2.5 Substrattoleranz der Acyl-CoA-Synthetasen LcfA und YhfL

Im Vergleich zum Surfactin und den untersuchten putativen FACS LcfA und YhfL ist eine Substrattoleranz ähnlich zum DptE zu verzeichnen. Allerdings wurden noch keine Kinetik-Untersuchungen durchgeführt und es kann an dieser Stelle nur auf grundlegende Eigenschaften eingegangen werden.

Die Ergebnisse aus den Fettsäureaktivierungs-Untersuchungen zeigten, dass die β -Hydroxy-myristinsäure, eine im Surfactin-Komplex natürlich vorkommende Fettsäure, mit guten Ausbeuten zum CoA-Thioester umgesetzt wurde. Dekansäure, die hingegen nicht im natürlichen Surfactin-Komplex vorkommt, wurde auch von YhfL und LcfA umgesetzt. Für Buttersäure hingegen konnte keine Aktivierung nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die FACS, für die eine Beteiligung an der Surfactin-Biosynthese postuliert wird, vermutlich ebenfalls ein

breites Substratspektrum aufweisen. Folglich liegt die Substratspezifität vermutlich auf der Seite der Starter-C-Domäne SrfA-M1-C.

7.2.6 Surfactin-Hämolyseaktivität der FACS-Mutanten

Da aus den vorangegangenen *in vitro* Versuchen belegt werden konnte, dass die Enzyme LcfA, YhfL und YhfT die in den *B. subtilis* Surfactin-Derivaten vorkommende β -Hydroxy-myristinsäure als Substrat akzeptierten, sollte nun *in vivo* geklärt werden, ob diese postulierten Enzyme auch wirklich mit der Surfactin-Produktion in Zusammenhang gebracht werden können. Dazu wurden zunächst die Gene einzeln durch selektierbare Resistenzkassetten deletiert. Mittels LB-Blutagar-Platten wurde auf Surfactin-Produktion hin untersucht. Dabei konnte visuell anfänglich kein Rückgang der Surfactin-Biosynthese verzeichnet werden. Jedoch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Enzyme gegenseitig komplementieren können. Solche Anpassungssysteme hat die Zelle im Laufe der Evolution entwickelt, um bei einem zufälligen Defekt eines Systems nicht sofort die ganze Zelle zu gefährden. Ein Beispiel sind hierfür die Kälteschock-Proteine (CspB, CspC und CspD), die in dreifacher Kopie vorliegen und sich gegenseitig komplementieren können.^{[239][240]} Besitzen die putativen FACS solche *back-up* Systeme, haben die Einfachdeletionen keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Surfactin-Produktion. Um dies zu umgehen, wurden Doppel- und Dreifach-Mutanten generiert. Die Produktion von Surfactin wurde zum einen auf LB-Blutagar und zum Anderen durch HPLC/MS analysiert. Zur Erinnerung: In den genannten Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich die Surfactin-Biosynthese stark verminderte im Vergleich der des Wildtyp-Stamms *B. subtilis* OKB105. Die Einfach-Mutanten MW2 (Δ lcfA) und MW3 (Δ yhfL) wiesen eine um 25% verringerte Surfactin-Produktion auf. Interessanterweise zeigte die Einfach-Mutante MW1 (Δ yngI) eine um 50% verminderte Surfactin-Produktion. Bei der Doppel-Mutante MW8 (Δ lcfA/ Δ yhfT) konnte kein weiterer Rückgang der Surfactin-Produktion verzeichnet werden (Rückgang blieb bei 25%). Im Gegensatz dazu zeigte die Doppel-Mutante MW5 (Δ lcfA/ Δ yngI) eine um 85% verminderte Surfactin-Produktion und die Dreifach-Mutante MW11 (Δ lcfA/ Δ yhfT/ Δ yngI) hatte eine um 98% reduzierte Produktion. Aus diesen Ergebnissen darf angenommen werden, dass die Enzyme LcfA, YngI und YhfT einen Einfluss auf die Surfactin-Produktion haben. Weiter konnte beobachtet werden, dass

Yngl den größten Einfluss aufweist, da hier ein Rückgang von 50% in der Einfach-Mutante und in der Doppel-Mutante, in der noch zusätzlich *lcfA* deletiert wurde, eine Verminderung um 85% zu verzeichnen war. Die Dreifach-Mutante zeigte nahezu keine Surfactin-Produktion mehr (Restproduktion ca. 2%). Da aber *yhfl* nicht deletiert werden konnte und auch die Doppel-Mutante MW6 ($\Delta yngl/\Delta yhfT$) im verwendeten SPIII-Medium nicht gewachsen war, können an dieser Stelle keine endgültigen Angaben über die Beteiligung einzelner oder mehrerer Enzyme an der Surfactin-Produktion gemacht werden.

Weshalb die Doppel-Mutante MW6 ($\Delta yngl/\Delta yhfT$) nicht gewachsen ist, ist unklar. In der Literatur wurde für zwei FACS *LcfA1* und *LcfA2* aus *Schizosaccharomyces pombe* ein ähnliches Verhalten beschrieben. Wurden in dem Organismus beide Gene deletiert, resultierte das in einem Phänotyp der sehr schlecht die stationäre Phase erreichte.^[99] Wenn dieses Verhalten für die Doppel-Mutante eine Erklärung wäre, dann hätte die Dreifach-Mutante ebenfalls diesen Phänotyp aufweisen müssen, dies war jedoch nicht der Fall.

Dass die Generation der *yhfl*-Deletionsmutante nicht gelang, lässt vermuten, dass *YhfL* möglicherweise essenziell sein könnte. Dies kann jedoch nicht bestätigt werden, da aus dem *B. subtilis* Genom-Projekt, bei dem die Deletion von *yhfl* im MR168-Stamm bereits erhalten werden konnte, bekannt war, dass diese Deletion keinen Einfluss auf das Wachstum hatte.

Möglicherweise könnte das Misslingen der *yhfl*-Mutanten darin begründet liegen, dass zur *in silico* Primersynthese die Gensequenz des Stammes MR168 verwendet wurde. Da aber die Gendeletion im OKB105-Stamm erfolgte, wegen der höheren Surfactin-Produktion, wäre es denkbar, dass sich die Bereiche um *yhfl* von OKB105 und MR168 zu stark unterscheiden, und dadurch eine homologe Rekombination ausblieb. Um dies ausschließen zu können, müsste der OKB105-Stamm in diesem Bereich sequenziert werden.

Jedoch ist abschließend festzuhalten, dass die enormen Auswirkungen auf die Produktion von Surfactin, vor allem von der Dreifach-Mutante, und auch die Aktivierung der, in Surfactin natürlich vorkommenden Fettsäure, β -Hydroxymyristinsäure Indizien aufweisen, dass diese Enzyme direkt oder indirekt an der Surfactin-Biosynthese involviert sind.

7.3 Initiationsreaktionen von NRPS-Systemen allgemein

Initiationsmodule von NRPS-Systemen die L-Aminosäuren aktivieren bestehen in der Regel aus zwei Domänen, der A-Domäne und der PCP-Domäne (A-PCP). Diese Bidomäne, wie sie z. B. bei der Vancomycin-Synthetase vorkommt, aktiviert als erstes Substrat L-Leucin und transferiert dieses wiederum auf das kognate PCP. Zum typischen Aufbau und Ablauf von Initiationsreaktionen regulärer NRPS-Systeme gibt es Abweichungen. Statt einer L-Aminosäure können auch D-Aminosäuren in das Peptidgerüst eingebaut werden. Hierbei gibt es NRPS-Systeme, die sich einer E-Domäne bedienen. Daraus folgt, dass ein solches Initiationsmodul aus drei Domänen besteht, der A-Domäne, der PCP-Domäne und der E-Domäne (A-PCP-E). Dies ist der Fall bei der Tyrocidin-Biosynthese (s. Abschnitt 2.4 der Einleitung).^[64] Eine andere Möglichkeit ist, dass die D-Aminosäure direkt, als kognates Substrat von der A-Domäne aktiviert wird. Ein Beispiel hierzu ist die Leinamycin-Biosynthese. LnmQ ist eine diskrete A-Domäne, die D-Alanin als Adenylat aktiviert und auf das ebenfalls diskrete PCP LnmP zur weiteren Peptidelongation transferiert.^[215] In der linearen Gramicidin-Biosynthese wird die erste Aminosäure L-Valin α -formyliert. Diese Aufgabe wiederum übernimmt eine Formyl-Transferase (F-Domäne), die sich am N-Terminus des Startmoduls befindet.^{[241][242]} Die oben genannten Beispiele beziehen sich ausschließlich auf Aminosäuren als Initiierungs-Spezies. Es gibt allerdings NRPS-Systeme, die anstelle von Aminosäuren auch aromatische Säuren, z. B. Salicylsäure, integrieren. Dies wurde im Fall von Yersinabactin^[243] beschrieben und für die Thiocoralin-Biosynthese postuliert.^[244] Hierbei erfolgt die Aktivierung der aromatischen Säure über ein Acyl-CoA-Synthetase-ähnliches Enzym (AL-Domäne). Diese AL-Domäne oder die Carrier-Protein-Domäne (CP-Domäne) können wiederum fusioniert vorliegen, wie es für Yersinabactin beschrieben wurde. Die Yersinabactin AL-Domäne ist alleinstehend und die CP-Domäne N-terminal an das NRPS-System fusioniert. Für die Biosynthese von Thiocoralin hingegen werden für die Initiationsreaktion diskrete Enzyme postuliert.

Die Initiationsreaktion von Verbindungen mit Fettsäuren als Starter-Einheit ist für reine NRPS-Systeme bislang wenig bekannt. Damit scheinen die in dieser Arbeit vorgestellten Initiationsreaktionen von Daptomycin und Surfactin zwei neue Wege von NRPS-Initiationsreaktionen darzustellen.

7.4 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit für Daptomycin gezeigt werden, dass die potenzielle Acyl-CoA-Synthetase DptE in der Lage ist verschiedene Fettsäuren als Adenylat zu aktivieren und auf das ACP DptF zu transferieren.

Es bleibt jedoch weiterhin die Frage offen, welche Funktion die Starter-C-Domäne von Daptomycin übernimmt und wie hoch deren Spezifität gegenüber verschiedenen Substraten ist. Um dabei das Löslichkeitsproblem zu umgehen, ist es notwendig, das Modul in einem anderen Organismus, der für Actinomyceten besser geeignet scheint als *E. coli*, zu exprimieren. Eine weitere Möglichkeit könnte auch die Expression der C- und PCP-Domäne als diskrete Proteine darstellen. Dadurch könnte möglicherweise die Löslichkeit und Aktivität weiter erhöht werden.

Für Surfactin konnte in ersten Versuchen gezeigt werden, insbesondere in Form von Deletionsmutanten, dass es einen Zusammenhang zwischen potenziellen Acyl-CoA-Synthetasen und der Surfactin Produktion gibt. Weiter gilt es insbesondere die in dieser Arbeit nicht erhaltenen Deletionsmutanten zu generieren, und den Einfluss auf die Surfactin-Produktion in weiteren Versuchen zu testen. Des Weiteren bleibt die Bindung des Fettsäuresubstrats an das Glutaminsäure-aktivierende Modul von SrfA ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Festhaltend wurden in der vorliegenden Arbeit Voraussetzungen zum besseren Verständnis von NRPS-Initiationsreaktionen zyklischer Lipopeptide geschaffen. Durch die erhaltenen Erkenntnisse über den Acylierungsprozess medizinisch-interessanter NRPS-Produkte könnten in Zukunft neue Wirkstoffe durch gezielte Manipulation dieser Enzyme, hervorgebracht werden, die eine verbesserte Bioaktivität aufweisen.

8 Anhang

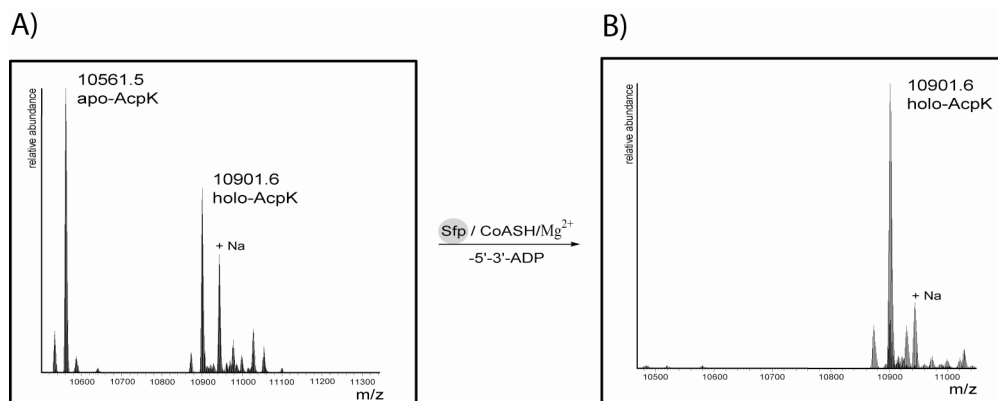


Abb. 8-1. ESI-MS-Spektren von AcpK

A) ESI-MS-Spektrum von AcpK nach Expression und Reinigung in *E. coli* M15/pRep4-*gsp* (HM404).
 B) Nachmodifikation von apo-AcpK das aus A) gewonnen Proteins mit Sfp.

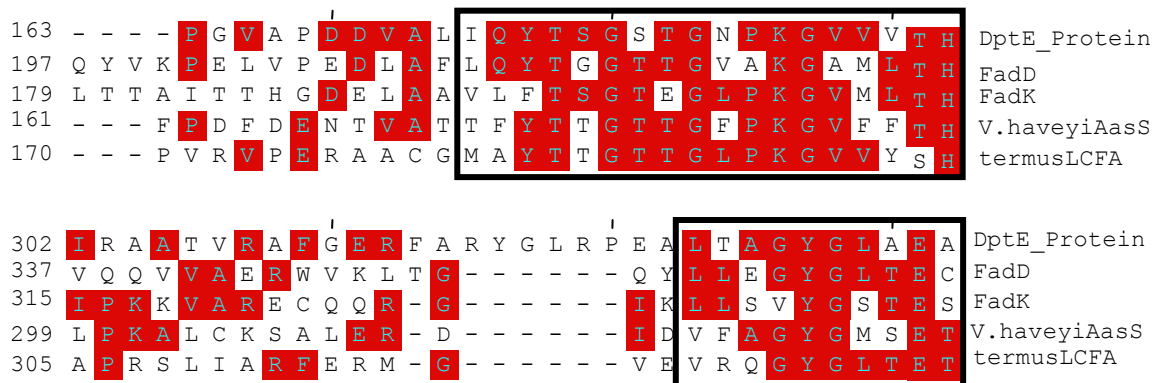


Abb. 8-2. Das ATP-Bindungsmotiv von Acyl-CoA-Synthetasen

Dargestellt ist ein ClustalW-Alignment von DptE mit verschiedenen Acyl-CoA-Synthetasen. FadD und FadK aus *E. coli*, AasS aus *V. haveyi*, LcfA aus *T. thermophilus*. Das ATP-Bindungsmotiv besteht aus zwei konservierten Regionen dargestellt durch einen schwarzen Kasten.

420	Q	T	F	G	L	T	L	D	G	E	D	G	H	W	L	R	T	G	D	L	A	A	L	H	-	E	G	N	L	H	DptE_Protein
427	-	-	-	E	I	I	K	N	G	-	-	-	-	W	L	H	T	G	D	I	A	V	M	D	E	E	G	F	L	R	FadD
405	R	-	-	A	L	D	E	E	G	-	-	-	-	W	Y	Y	S	G	D	L	C	R	M	D	E	A	G	Y	I	K	FadK
400	-	-	-	A	L	W	R	G	G	-	-	-	-	Y	L	H	T	G	D	V	A	H	I	D	D	E	G	F	I	K	V.haveyiAasS
406	S	-	-	A	L	T	P	D	G	-	-	-	-	F	F	R	T	G	D	I	A	V	W	D	E	E	G	Y	V	E	termusLCFA

449	I	T	G	R	C	K	E	A	L	V	I	R	G	R	N	L	Y	P	Q	D	I	E	H	E	L	R	L	Q	H	P	DptE_Protein
450	I	V	D	R	K	K	D	M	I	L	V	S	G	F	N	V	Y	P	N	E	I	E	D	V	V	-	M	Q	H	P	FadD
429	I	T	G	R	K	K	D	I	I	V	R	G	G	E	N	I	S	S	R	E	V	E	D	I	L	-	L	Q	H	P	FadK
423	I	T	D	R	V	K	D	M	I	K	I	S	G	E	W	V	S	S	L	E	L	E	D	I	L	-	H	Q	H	Q	V.haveyiAasS
430	I	K	D	R	L	K	D	L	I	K	S	G	G	E	W	I	S	S	V	D	L	E	N	A	L	-	M	G	H	P	termusLCFA

Abb. 8-3. ClustalW-Alignment der FACS-Region

Das FACS-Motiv umfasst 25 Aminosäuren (DGWLHTGDIGxWxPxGxLKIIDRKK).

31	R	I	A	G	D	A	P	L	T	D	H	G	L	D	S	V	S	G	V	A	L	C	A	Q	V	E	D	R	Y	G	dptF
31	T	I	A	T	D	L	P	L	T	S	Y	G	L	D	S	V	Y	A	L	S	I	A	A	E	L	E	D	H	L	D	LipD
25	R	F	E	P	E	D	Q	L	V	E	L	G	A	D	S	V	D	R	A	E	I	I	T	M	V	L	E	D	L	S	AcpK

Abb. 8-4: ClustalW-Alignment der ACPs

Dargestellt ist ein Ausschnitt des Sequenzalignments der drei ACPs. Der schwarze Kasten kennzeichnet das Bindungsmotiv mit dem konservierten Serin-Rest.

5'gga tcc ATG GAT ATG CAA TCT CAG CGT CTG GGT GTT ACT GCT GCT CAA CAG AGC GTT
TGG CTG GCT GGT CAA CTG GCG GAC GAT CAC CGC CTG TAT CAT TGT GCG GCG TAC CTG
AGC CTG ACT GGC TCT ATT GAC CCG CGC ACC CTG GGT ACG GCG GTG CGT CGT ACT CTG
GAC GAG ACC GAA GCG CTG CGT ACT CGT TTT GTA CCG CAG GAC GGT GAA CTG ACT CAA
ATC CTG GAA CCG GGT GCG GGC CAG CTG CTG GAA GCG GAC TTC TCT GGT GAC CCG
GAC CCG GAG CGT GCG GCA CAT GAT TGG ATG CAC GCG GCG CTG GCT GCA CCG GTT
CGT CTG GAT CGC GCA GGT ACC GCT ACC CAT GCA CTG CTG ACT CTG GGC CCG TCC CGT
CAC CTG CTG TAT TTC GGT TAC CAT CAC ATT GCG CTG GAT GGC TAT GGT GCC CTG CTG
CAC CTG CGC CGT CTG GCG CAT GTT TAT ACC GCT CTG AGC AAC GGT GAT GAC CCG GGC
CCT TGT CCG TTT GGC CCG CTG GCT GGT GTG CTG ACG GAA GAA GCG GCT TAC CGT GAC
TCT GAT AAT CAT CGT CGC GAC GGT GAA TTC TGG ACT CGT TCC CTG GCG GGT GCG GAT
GAG GCT CCT GGT CTG AGC GAA CGT GAG GCG GGC GCT CTG GCG GTT CCG CTG CGT
CGT ACC GTG GAA CTG TCC GGC GAA CGT ACG GAA AAA CTG GCG GCT TCT GCA GCG GCT
ACT GGT GCT CGT TGG TCC AGC CTG CTG GTT GCT GCT ACT GCG GCG TTC GTA CGT CGC
CAT GCT GCC GCT GAT GAT ACC GTG ATT GGT CTG CCT GTT ACC GCT CGT CTG ACT GGT
CCG GCG CTG CGT ACC CCG TGC ATG CTG GCT AAC GAT GTG CCG CTG CGC CTG GAC GCT
CGT CTG GAT GCT CCG TTT GCG GCG CTG CTG GCT GAT ACT ACT CGC GCG GTT GGT ACG
CTG GCG CGT CAT CAG CGC TTT CGT GGT GAA GAA CTG CAC CGT AAC CTG GGT GGC GTG
GGT CGT ACC GCG GGC CTG GCG CGC GTC ACT GTG AAC GTT CTG GCG TAT GTG GAC AAC
ATT CGT TTC GGT GAT TGT CGT GCT GTG GTT CAC GAG CTG TCT AGC GGT CCG GTT CGT
GAC TTT CAC ATC AAC TCC TAT GGT ACT CCA GGC ACC CCG GAT GGC GTC CAG CTG GTT
TTC AGC GGT AAT CCT GCT CTG TAC ACG GCA ACC GAT CTG GCT GAT CAC CAG GAA CGT

TTC CTG CGT TTT CTG GAC GCT GTG ACT GCT GAC CCG GAT CTG CCG ACC GGT CGC CAC
CGT CTG CTG TCT CCG GGT ACT CGC GCT CGT CTG CTG GAC GAT TCC CGC GGC ACG GAA
CGT CCG GTA CCG CGT GCA ACT CTG CCG GAA CTG TTC GCT GAA CAG GCA CGT CGT ACC
CCA GAT GCG CCT GCT GTT CAG CAC GAT GGT ACC GTT CTG ACC TAT CGC GAC CTG CAC
CGT TCT GTT GAA CGC GCG GCA GGT CGT CTG GCT GGC CTG GGC CTG CGT ACT GAG GAT
GTT GTT GCT CTG GCA CTG CCT AAA TCT GCA GAA AGC GTT GCG ATT CTG CTG GGT ATT
CAG CGC GCC GGT GCT GCA TAC GTG CCG CTG GAC CCA ACC CAT CCG GCT GAA CGT CTG
GCT CGT GTA CTG GAC GAT ACT CGC CCG CGT TAC CTG GTT ACT ACC GGT CAC ATC GAT
GGT CTG TCT CAC CCG ACT CCG CAG CTG GCA GCA GCA GAC CTG CTG CGT GAA GGT GGC
CCA GAG CCA GCC CCG GGT CGC CCG GCA CCT GGT AAC GCG GCG TAC ATC ATC CAG
ACC TCC GGT TCT ACC GGT CGC CCG AAA GGT GTT GTT GTT ACT CAC GAA GGT CTG GCC
ACC CTG GCC GCA GAT CAG ATC CGT CGC TAC CGC ACG GGT CCG GAT GCA CGT GTA CTG
CAG TTC ATC TCT CC GG GTT TCG ACG TTT TTG TTT CTG AAC TGA GCA TGA CCC TGC TGT
CCG GTG GCT GCC TGG TGA TTC CGC CGG ATG GCC TGA CCG GTC GTC ACC TGG CCG ACT
TCC TGG CAG CGG AAG CCG TTA CCA CCA CGT CCC TGA CCC CAG GTG CAC TGG CAA CCA
TGC CTG CCA CTG ATC TGC CGC ACC TGC GTA CTC TGA TCG TGG GCG GTG AGG TTT GCC
CGC CGG AAA TCT TCG ATC AGT GGG GCC GTG GCC GTG ATA TCG TTA ACG CGT ACG GTC
CAA CCG AAA CGA CCG TTG AAG CGA CCG CAT GGC ACC GTG ACG GTG CAA CCC ACG GCC
CGG TGC CGC TGG GCC GTC CGA CCC TGA ACC GCC GCG GCT ACG TGC TGG ACC CAG
CGC TGG AAC CGG TAC CGG ATG GTA CGA CCG GCG AAC TGT ACC TGG CAG GCG AAG
GCC TGG CCC GCG GCT ACG TAG CTG CCC CGG GTC CTA CCG CAG AGC GTT TCG TAG
CAG ATC CGT TTG GCC CGC CAG GCA GCC GCA TGT ACC GTA CCG GCG ACC TGG TGC
GCC GTC GTT CTG GCG GCA TGC TGG AAT TCG TAG GCC GTG CAG ACG GCC AGG TAA AAC
TGC GTG GCT TCC GTA TCG AAC TGG GCG AAG TAC AGG CAG CGC TGA CCG CTC TGC CGG
GCG TAC GTC AGG CAG GCG TAC TGA TCC GCG AGG ACC GTC CGG GCG ACC CAC GCC
TGG TCG GCT ACA TCG TGC CGG CAC CGG GCG CGG AAC CGG ACG CCG GTG AAC TGC
GCG CCG CAC TGG CCC GTA CCC TGC CGC CGC ACA TGG TGC CGT GGG CGC TGG TCC
CGC TGC CTG CAC TGC CGC TGA CGT CCA ACG GCA AAC TGG ACC GTG CGG CCC TGC
CAG TCC CGG CTG CGC GCG CCG GCG GTT CTG GCC AAC GCC CGG TCA CCC CAC AGG
AAA AGA CCC TGT GCG CCC TGT TCG CCG ACG TCC TGG GCG TAA CGG AAG TCG CCA CGG
ACG ACG TGT TCT TCG AGC TGG GTG GCC ACT CCC TGA ACG GCA CCC GCC TGC TGG CCC
GCA TCC GCA CCG AGT TCG GCA CCG ACC TGA CCC TGC GCG ACC TGT TCG CCT TCC CAA
CCG TCG CCG GCC TGC TGC CGC TGC TGG ACG ACA Acg cgg ccg c 3'

Abb. 8-5. Für die Expression in *E. coli* optimierte DNA-Sequenz von DptA-1M (3086 bp; EZBiolab) geliefert im Vektor pBluescriptII SK (+)

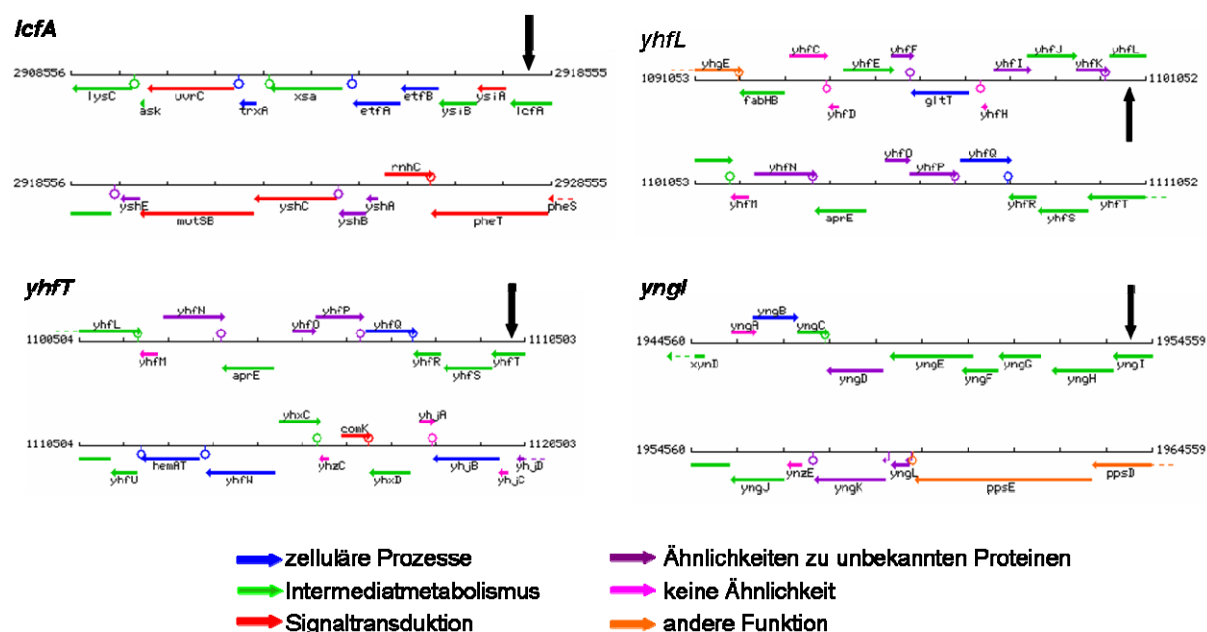


Abb. 8-6. Umgebung der Gene *lcfA*, *yhfL*, *yhfT* und *yngI*

Ausschnitte der Genregion der Gene, deren Produkte eine Funktion am Initiierungsprozess der Surfactin-Biosynthese zugeschrieben wird. Durch schwarze Pfeile werden die entsprechenden Gene hervorgehoben. Für eine genaue Beschreibung der umliegenden Gensequenzen s. Tab. 8-1 bis Tab. 8-4

Tab. 8-1. Gene in der Region von *yngI*

Gen-Nam e	Gengröße (bp)	Beschreibung
<i>yngD</i>	1197	unbekannt
<i>yngE</i>	1785	Unbekannt, besitzt Ähnlichkeit zu Propionyl-CoA-Carboxylasen
<i>yngF</i>	780	Unbekannt, besitzt Ähnlichkeiten zu 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratesen
<i>yngG</i>	897	Unbekannt, Ähnlichkeiten zu Hydroxymethylglutaryl-CoA-Lyasen
<i>yngH</i>	1332	Unbekannt, Ähnlichkeit zur Biotin-Carboxylase
<i>yngI</i>	1647	Unbekannt, Ähnlichkeit zu langkettigen-Acyl-CoA-Ligasen
<i>yngJ</i>	1140	Unbekannt, Ähnlichkeit zu Butyryl-CoA-Dehydrogenasen
<i>ynzE</i>	303	unbekannt
<i>yngK</i>	1530	unbekannt

Tab. 8-2. Gene in der Region von *yhfl*

Gen-Name	Gengröße (bp)	Beschreibung
<i>yhfh</i>	138	unbekannt
<i>yhfl</i>	732	unbekannt
<i>yhfJ</i>	993	Unbekannt, Ähnlichkeit zu Lipoate-Protein-Ligasen
<i>yhfK</i>	642	unbekannt
<i>yhfL</i>	1539	Unbekannt, Ähnlichkeiten zu langkettigen-Acyl-CoA-Ligasen
<i>yhfM</i>	393	unbekannt
<i>yhfN</i>	1278	unbekannt

Tab. 8-3. Gene in der Region von *yhfT*

Gen-Name	Gengröße (bp)	Beschreibung
<i>yhfR</i>	579	Unbekannt, Ähnlichkeiten zu 2,3-Diphosphoglycerat-abhängige Phosphoglycerat Mutasen
<i>yhfS</i>	1092	Unbekannt, Ähnlichkeit zur Acetyl-CoA C-Acetyltransferase
<i>yhfT</i>	1437	Unbekannt, Ähnlichkeiten langkettigen-Acyl-CoA-Ligasen
<i>yhfU</i>	558	Unbekannt, Ähnlichkeit zur Biotin-Biosynthese

Tab. 8-4. Gene in der Region von *lcfA*

Gen-Name	Gengröße (bp)	Beschreibung
<i>etfA</i>	975	Elektronentransfer Flavoprotein (α -Untereinheit)
<i>etfB</i>	771	Elektronentransfer Flavoprotein (β -Untereinheit)
<i>ysiB</i>	774	Unbekannt, Ähnlichkeit zu 3-hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenasen
<i>ysiA</i>	582	Unbekannt, Ähnlichkeit zum Transkriptionsregulator (TetR/AcrR Familie)
<i>lcfA</i>	1680	Langkettige Fettsäure-CoA-Synthetase
<i>yshE</i>	402	Unbekannt
<i>mutSB</i>	2355	Vermutlich DNA mismatch Reparatur Protein
<i>yshC</i>	1710	Unbekannt, Ähnlichkeit zu DNA-Polymerase beta

205	P	E	-	D	L	A	F	L	Q	Y	T	G	G	T	T	G	V	A	K	G	A	M	L	T	H	R	N	M	L	A	FadD
204	P	E	H	D	I	A	V	L	Q	Y	T	G	G	T	T	G	A	P	K	G	V	M	L	T	H	Q	N	I	L	A	Lcfa
167	P	D	-	D	T	A	V	I	L	Y	T	S	G	T	T	G	K	P	K	G	A	M	L	T	H	Q	N	L	Y	S	YhfL
189	K	D	-	N	V	I	N	M	Q	Y	T	S	G	T	T	G	F	P	K	G	V	M	L	T	H	F	N	V	I	N	YngI
141	P	E	-	H	P	F	Y	M	G	F	T	S	G	S	T	G	K	P	K	A	F	T	R	S	H	R	S	W	M	E	YhfT

353	L	L	E	G	Y	G	L	T	E	C	A	P	L	V	S	V	N	P	Y	D	I	-	-	D	Y	H	S	G	S	I	FadD
351	L	V	E	G	Y	G	L	S	E	A	S	P	V	T	H	A	N	F	I	W	G	-	-	K	N	K	P	G	S	I	Lcfa
311	I	L	E	G	Y	G	L	S	E	A	S	P	V	T	C	F	N	P	F	D	R	-	-	G	R	K	P	G	S	I	YhfL
334	I	T	I	A	Y	G	Q	T	E	A	S	P	V	I	T	Q	T	R	A	N	D	S	F	I	R	R	V	E	T	T	YngI
281	L	Y	D	F	Y	G	T	S	E	L	S	F	V	T	F	S	S	P	E	D	S	-	-	K	R	K	P	H	S	A	YhfT

Abb. 8-7. Das ATP-Bindungsmotiv von Acyl-CoA-Synthetasen

Dargestellt ist ein ClustalW-Alignment von den CoA-Synthetasen aus *B. subtilis* MR168 mit FadD aus *E. coli*. Das ATP-Bindungsmotiv besteht aus zwei konservierten Regionen dargestellt durch einen schwarzen Kasten.

410	K	G	P	Q	V	M	L	G	Y	W	Q	R	P	D	A	T	D	E	I	I	K	-	N	G	W	L	H	T	G	D	FadD
409	K	G	P	Q	V	M	K	G	Y	W	N	K	P	E	E	T	A	A	V	L	R	-	D	G	W	L	F	T	G	D	Lcfa
368	K	G	P	N	V	M	K	G	Y	Y	K	M	P	M	E	T	E	H	A	L	K	-	D	G	W	L	Y	T	G	D	YhfL
394	R	G	Y	H	V	M	K	G	Y	Y	K	D	K	D	A	T	R	K	A	I	N	H	D	G	W	L	F	T	G	D	YngI
338	K	S	P	M	R	F	S	G	Y	V	N	G	-	-	S	T	P	-	-	-	-	-	D	E	W	M	T	V	D	D	YhfT

439	I	A	V	M	D	E	E	G	F	L	R	I	V	D	R	K	K	D	M	I	L	V	S	G	F	N	V	Y	P	N	FadD
438	M	G	Y	M	D	E	E	G	F	F	Y	I	A	D	R	K	K	D	I	I	I	A	G	G	Y	N	I	Y	P	R	Lcfa
397	L	A	R	R	D	E	D	G	Y	F	Y	I	V	D	R	K	K	D	M	I	I	V	G	G	Y	N	V	Y	P	R	YhfL
424	L	A	V	M	D	E	D	G	Y	C	R	I	T	G	R	L	K	D	M	L	I	R	G	G	E	N	I	Y	P	R	YngI
361	M	G	Y	V	D	E	E	G	F	L	Y	I	S	G	R	E	N	G	M	I	V	Y	G	G	L	N	I	F	P	E	YhfT

Abb. 8-8. ClustalW-Alignment der FACS-Region

Das FACS-Motiv umfasst 25 Aminosäuren (DGWLHTGDIGxWxPxGxLKIIDRKK).

9 Literaturverzeichnis

1. Flemming, P., *The Medical Aspects of the Mediaeval Monastery in England*. Proc R Soc Med, 1929. **22**(6): p. 771-782.
2. King, M.D., et al., *Emergence of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus USA 300 clone as the predominant cause of skin and soft-tissue infections*. Ann Intern Med, 2006. **144**(5): p. 309-17.
3. Baltz, R.H., *Biosynthesis and genetic engineering of lipopeptide antibiotics related to daptomycin*. Curr Top Med Chem, 2008. **8**(8): p. 618-38.
4. Felnagle, E.A., et al., *Nonribosomal peptide synthetases involved in the production of medically relevant natural products*. Mol Pharm, 2008. **5**(2): p. 191-211.
5. Fischbach, M.A. and C.T. Walsh, *Biochemistry. Directing biosynthesis*. Science, 2006. **314**(5799): p. 603-5.
6. Bode, H.B. and R. Muller, *Analysis of myxobacterial secondary metabolism goes molecular*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2006. **33**(7): p. 577-88.
7. Duan, K., et al., *Chemical interactions between organisms in microbial communities*. Contrib Microbiol, 2009. **16**: p. 1-17.
8. Katz, E. and A.L. Demain, *The peptide antibiotics of Bacillus: chemistry, biogenesis, and possible functions*. Bacteriol Rev, 1977. **41**(2): p. 449-74.
9. Vining, L.C., *Functions of secondary metabolites*. Annu Rev Microbiol, 1990. **44**: p. 395-427.
10. Zuber, P., *Non-ribosomal peptide synthesis*. Curr Opin Cell Biol, 1991. **3**(6): p. 1046-50.
11. Yim, G., H.H. Wang, and J. Davies, *Antibiotics as signalling molecules*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2007. **362**(1483): p. 1195-200.
12. Davies, J., *Where have All the Antibiotics Gone?* Can J Infect Dis Med Microbiol, 2006. **17**(5): p. 287-90.
13. Pelaez, F., *The historical delivery of antibiotics from microbial natural products--can history repeat?* Biochem Pharmacol, 2006. **71**(7): p. 981-90.
14. Demain, A.L. and S. Sanchez, *Microbial drug discovery: 80 years of progress*. J Antibiot (Tokyo), 2009. **62**(1): p. 5-16.
15. Baker, D.D., et al., *The value of natural products to future pharmaceutical discovery*. Nat Prod Rep, 2007. **24**(6): p. 1225-44.
16. Klein, C., et al., *Analysis of genes involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin*. Appl Environ Microbiol, 1992. **58**(1): p. 132-42.
17. Marahiel, M.A., *Working outside the protein-synthesis rules: insights into non-ribosomal peptide synthesis*. J Pept Sci, 2009. **15**(12): p. 799-807.
18. Marahiel, M.A. and L.O. Essen, *Chapter 13. Nonribosomal peptide synthetases mechanistic and structural aspects of essential domains*. Methods Enzymol, 2009. **458**: p. 337-51.
19. Nolan, E.M. and C.T. Walsh, *How nature morphs peptide scaffolds into antibiotics*. Chembiochem, 2009. **10**(1): p. 34-53.
20. Kleinkauf, H. and W. Gevers, *Nonribosomal polypeptide synthesis: the biosynthesis of a cyclic peptide antibiotic, gramicidin S*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1969. **34**: p. 805-13.
21. Caboche, S., et al., *NORINE: a database of nonribosomal peptides*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Database issue): p. D326-31.
22. Zhang, H., Y. Wang, and B.A. Pfeifer, *Bacterial hosts for natural product production*. Mol Pharm, 2008. **5**(2): p. 212-25.

23. Stack, D., C. Neville, and S. Doyle, *Nonribosomal peptide synthesis in Aspergillus fumigatus and other fungi*. Microbiology, 2007. **153**(Pt 5): p. 1297-306.
24. Marahiel, M.A., *Protein templates for the biosynthesis of peptide antibiotics*. Chem Biol, 1997. **4**(8): p. 561-7.
25. Kleinkauf, H. and H. von Dohren, *Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics*. Eur J Biochem, 1990. **192**(1): p. 1-15.
26. Wilkinson, B. and J. Micklefield, *Chapter 14. Biosynthesis of nonribosomal peptide precursors*. Methods Enzymol, 2009. **458**: p. 353-78.
27. Wilkinson, B. and J. Micklefield, *Mining and engineering natural-product biosynthetic pathways*. Nat Chem Biol, 2007. **3**(7): p. 379-86.
28. Zerkly, M. and G.L. Challis, *Strategies for the discovery of new natural products by genome mining*. Chembiochem, 2009. **10**(4): p. 625-33.
29. Corre, C. and G.L. Challis, *New natural product biosynthetic chemistry discovered by genome mining*. Nat Prod Rep, 2009. **26**(8): p. 977-86.
30. Van Lanen, S.G. and B. Shen, *Microbial genomics for the improvement of natural product discovery*. Curr Opin Microbiol, 2006. **9**(3): p. 252-60.
31. Schlumbohm, W., et al., *An active serine is involved in covalent substrate amino acid binding at each reaction center of gramicidin S synthetase*. J Biol Chem, 1991. **266**(34): p. 23135-41.
32. Nakano, M.M. and P. Zuber, *Molecular biology of antibiotic production in Bacillus*. Crit Rev Biotechnol, 1990. **10**(3): p. 223-40.
33. Laland, S.G. and T.L. Zimmer, *The protein thiotemplate mechanism of synthesis for the peptide antibiotics produced by Bacillus brevis*. Essays Biochem, 1973. **9**: p. 31-57.
34. Samel, S.A., et al., *Structural and functional insights into a peptide bond-forming bidomain from a nonribosomal peptide synthetase*. Structure, 2007. **15**(7): p. 781-92.
35. Frueh, D.P., et al., *Dynamic thiolation-thioesterase structure of a non-ribosomal peptide synthetase*. Nature, 2008. **454**(7206): p. 903-6.
36. Mootz, H.D. and M.A. Marahiel, *Biosynthetic systems for nonribosomal peptide antibiotic assembly*. Curr Opin Chem Biol, 1997. **1**(4): p. 543-51.
37. Finking, R., M.R. Mofid, and M.A. Marahiel, *Mutational analysis of peptidyl carrier protein and acyl carrier protein synthase unveils residues involved in protein-protein recognition*. Biochemistry, 2004. **43**(28): p. 8946-56.
38. Grunewald, J. and M.A. Marahiel, *Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides*. Microbiol Mol Biol Rev, 2006. **70**(1): p. 121-46.
39. Mootz, H.D., et al., *Decreasing the ring size of a cyclic nonribosomal peptide antibiotic by in-frame module deletion in the biosynthetic genes*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(37): p. 10980-1.
40. Helmetag, V., et al., *Structural basis for the erythro-stereospecificity of the L-arginine oxygenase VioC in viomycin biosynthesis*. FEBS J, 2009. **276**(13): p. 3669-82.
41. Turgay, K., M. Krause, and M.A. Marahiel, *Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes*. Mol Microbiol, 1992. **6**(18): p. 2743-4.
42. Conti, E., N.P. Franks, and P. Brick, *Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes*. Structure, 1996. **4**(3): p. 287-98.
43. Becker-Andre, M., P. Schulze-Lefert, and K. Hahlbrock, *Structural comparison, modes of expression, and putative cis-acting elements of the two 4-coumarate: CoA ligase genes in potato*. J Biol Chem, 1991. **266**(13): p. 8551-9.
44. Connerton, I.F., et al., *Comparison and cross-species expression of the acetyl-CoA synthetase genes of the Ascomycete fungi, Aspergillus nidulans and Neurospora crassa*. Mol Microbiol, 1990. **4**(3): p. 451-60.

45. Gulick, A.M., *Conformational dynamics in the Acyl-CoA synthetases, adenylation domains of non-ribosomal peptide synthetases, and firefly luciferase*. ACS Chem Biol, 2009. **4**(10): p. 811-27.
46. Dieckmann, R., et al., *Expression of an active adenylate-forming domain of peptide synthetases corresponding to acyl-CoA-synthetases*. FEBS Lett, 1995. **357**(2): p. 212-6.
47. Stachelhaus, T. and M.A. Marahiel, *Modular structure of peptide synthetases revealed by dissection of the multifunctional enzyme GrsA*. J Biol Chem, 1995. **270**(11): p. 6163-9.
48. Conti, E., et al., *Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S*. EMBO J, 1997. **16**(14): p. 4174-83.
49. Stachelhaus, T., H.D. Mootz, and M.A. Marahiel, *The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases*. Chem Biol, 1999. **6**(8): p. 493-505.
50. Stevens, B.W., et al., *Redesigning the PheA domain of gramicidin synthetase leads to a new understanding of the enzyme's mechanism and selectivity*. Biochemistry, 2006. **45**(51): p. 15495-504.
51. Pavela-Vrancic, M., R. Dieckmann, and H. von Dohren, *ATPase activity of non-ribosomal peptide synthetases*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1696**(1): p. 83-91.
52. Stachelhaus, T., A. Huser, and M.A. Marahiel, *Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases*. Chem Biol, 1996. **3**(11): p. 913-21.
53. Gocht, M. and M.A. Marahiel, *Analysis of core sequences in the D-Phe activating domain of the multifunctional peptide synthetase TycA by site-directed mutagenesis*. J Bacteriol, 1994. **176**(9): p. 2654-62.
54. Vollenbroich, D., et al., *Analysis of surfactin synthetase subunits in *srfA* mutants of *Bacillus subtilis* OKB105*. J Bacteriol, 1994. **176**(2): p. 395-400.
55. Quadri, L.E., et al., *Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases*. Biochemistry, 1998. **37**(6): p. 1585-95.
56. Koglin, A., et al., *Conformational switches modulate protein interactions in peptide antibiotic synthetases*. Science, 2006. **312**(5771): p. 273-6.
57. Stachelhaus, T., et al., *Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain*. J Biol Chem, 1998. **273**(35): p. 22773-81.
58. Vater, J., et al., *The modular organization of multifunctional peptide synthetases*. J Protein Chem, 1997. **16**(5): p. 557-64.
59. Mootz, H.D., D. Schwarzer, and M.A. Marahiel, *Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases*. Chembiochem, 2002. **3**(6): p. 490-504.
60. Belshaw, P.J., C.T. Walsh, and T. Stachelhaus, *Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis*. Science, 1999. **284**(5413): p. 486-9.
61. Clugston, S.L., et al., *Chirality of peptide bond-forming condensation domains in nonribosomal peptide synthetases: the C5 domain of tyrocidine synthetase is a (D)C(L) catalyst*. Biochemistry, 2003. **42**(41): p. 12095-104.
62. Keating, T.A., et al., *The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(7): p. 522-6.
63. De Crecy-Lagard, V., P. Marliere, and W. Saurin, *Multienzymatic non ribosomal peptide biosynthesis: identification of the functional domains catalysing peptide elongation and epimerisation*. C R Acad Sci III, 1995. **318**(9): p. 927-36.

64. Mootz, H.D. and M.A. Marahiel, *The tyrocidine biosynthesis operon of Bacillus brevis: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains*. J Bacteriol, 1997. **179**(21): p. 6843-50.
65. Rausch, C., et al., *Phylogenetic analysis of condensation domains in NRPS sheds light on their functional evolution*. BMC Evol Biol, 2007. **7**: p. 78.
66. de Crecy-Lagard, V., et al., *Streptogramin B biosynthesis in Streptomyces pristinaespiralis and Streptomyces virginiae: molecular characterization of the last structural peptide synthetase gene*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(9): p. 1904-9.
67. Konz, D., S. Doekel, and M.A. Marahiel, *Molecular and biochemical characterization of the protein template controlling biosynthesis of the lipopeptide lichenysin*. J Bacteriol, 1999. **181**(1): p. 133-40.
68. Ullrich, C., et al., *Cell-free biosynthesis of surfactin, a cyclic lipopeptide produced by Bacillus subtilis*. Biochemistry, 1991. **30**(26): p. 6503-8.
69. Stein, D.B., U. Linne, and M.A. Marahiel, *Utility of epimerization domains for the redesign of nonribosomal peptide synthetases*. FEBS J, 2005. **272**(17): p. 4506-20.
70. Marahiel, M.A., T. Stachelhaus, and H.D. Mootz, *Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis*. Chem Rev, 1997. **97**(7): p. 2651-2674.
71. Stein, D.B., et al., *Impact of epimerization domains on the intermodular transfer of enzyme-bound intermediates in nonribosomal peptide synthesis*. Chembiochem, 2006. **7**(11): p. 1807-14.
72. Stachelhaus, T. and M.A. Marahiel, *Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis*. FEMS Microbiol Lett, 1995. **125**(1): p. 3-14.
73. Linne, U., et al., *Systematic and quantitative analysis of protein-protein recognition between nonribosomal peptide synthetases investigated in the tyrocidine biosynthetic template*. Biochemistry, 2003. **42**(17): p. 5114-24.
74. Haese, A., et al., *Molecular characterization of the enniatin synthetase gene encoding a multifunctional enzyme catalysing N-methyldepsipeptide formation in Fusarium scirpi*. Mol Microbiol, 1993. **7**(6): p. 905-14.
75. Haese, A., et al., *Bacterial expression of catalytically active fragments of the multifunctional enzyme enniatin synthetase*. J Mol Biol, 1994. **243**(1): p. 116-22.
76. Sieber, S.A. and M.A. Marahiel, *Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics*. Chem Rev, 2005. **105**(2): p. 715-38.
77. Rizo, J. and L.M. Gierasch, *Constrained peptides: models of bioactive peptides and protein substructures*. Annu Rev Biochem, 1992. **61**: p. 387-418.
78. Losey, H.C., et al., *Incorporation of glucose analogs by GtfE and GtfD from the vancomycin biosynthetic pathway to generate variant glycopeptides*. Chem Biol, 2002. **9**(12): p. 1305-14.
79. Nguyen, K.T., et al., *Genetically Engineered Lipopeptide Antibiotics Related to A54145 and Daptomycin with Improved Properties*. Antimicrob Agents Chemother, 2010.
80. Stachelhaus, T., A. Schneider, and M.A. Marahiel, *Engineered biosynthesis of peptide antibiotics*. Biochem Pharmacol, 1996. **52**(2): p. 177-86.
81. Mootz, H.D. and M.A. Marahiel, *Design and application of multimodular peptide synthetases*. Curr Opin Biotechnol, 1999. **10**(4): p. 341-8.
82. Schneider, A. and M.A. Marahiel, *Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in non-ribosomal peptide biosynthesis in Bacillus subtilis*. Arch Microbiol, 1998. **169**(5): p. 404-10.
83. Wagner, B., et al., *Rational design of bacitracin A derivatives by incorporating natural product derived heterocycles*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(32): p. 10513-20.

84. Cosmina, P., et al., *Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in Bacillus subtilis*. Mol Microbiol, 1993. **8**(5): p. 821-31.
85. Schneider, A., T. Stachelhaus, and M.A. Marahiel, *Targeted alteration of the substrate specificity of peptide synthetases by rational module swapping*. Mol Gen Genet, 1998. **257**(3): p. 308-18.
86. Randhawa, Z.I. and S. Smith, *Complete amino acid sequence of the medium-chain S-acyl fatty acid synthetase thio ester hydrolase from rat mammary gland*. Biochemistry, 1987. **26**(5): p. 1365-73.
87. Koglin, A., et al., *Structural basis for the selectivity of the external thioesterase of the surfactin synthetase*. Nature, 2008. **454**(7206): p. 907-11.
88. Schwarzer, D., et al., *Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(22): p. 14083-8.
89. Linne, U., et al., *Mutational analysis of a type II thioesterase associated with nonribosomal peptide synthesis*. Eur J Biochem, 2004. **271**(8): p. 1536-45.
90. Tanovic, A., et al., *Crystal structure of the termination module of a nonribosomal peptide synthetase*. Science, 2008. **321**(5889): p. 659-63.
91. Hoyer, K.M., C. Mahlert, and M.A. Marahiel, *The iterative gramicidin s thioesterase catalyzes peptide ligation and cyclization*. Chem Biol, 2007. **14**(1): p. 13-22.
92. Lautru, S., et al., *Discovery of a new peptide natural product by Streptomyces coelicolor genome mining*. Nat Chem Biol, 2005. **1**(5): p. 265-9.
93. Fischbach, M.A. and C.T. Walsh, *Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal Peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms*. Chem Rev, 2006. **106**(8): p. 3468-96.
94. Weissman, K.J., *Polyketide synthases: mechanisms and models*. Ernst Schering Res Found Workshop, 2005(51): p. 43-78.
95. Mercer, A.C. and M.D. Burkart, *The ubiquitous carrier protein--a window to metabolite biosynthesis*. Nat Prod Rep, 2007. **24**(4): p. 750-73.
96. Du, L., C. Sanchez, and B. Shen, *Hybrid peptide-polyketide natural products: biosynthesis and prospects toward engineering novel molecules*. Metab Eng, 2001. **3**(1): p. 78-95.
97. Meier, J.L. and M.D. Burkart, *The chemical biology of modular biosynthetic enzymes*. Chem Soc Rev, 2009. **38**(7): p. 2012-45.
98. Harder, M.E., et al., *Mutants of Escherichia coli with temperature-sensitive malonyl coenzyme A-acyl carrier protein transacylase*. J Biol Chem, 1974. **249**(23): p. 7468-75.
99. Fujita, Y., H. Matsuoka, and K. Hirooka, *Regulation of fatty acid metabolism in bacteria*. Mol Microbiol, 2007. **66**(4): p. 829-39.
100. Mindich, L., *Control of fatty acid synthesis in bacteria*. J Bacteriol, 1972. **110**(1): p. 96-102.
101. Lambalot, R.H., et al., *A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases*. Chem Biol, 1996. **3**(11): p. 923-36.
102. Meier, J.L., et al., *Synthesis and evaluation of bioorthogonal pantetheine analogues for in vivo protein modification*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(37): p. 12174-84.
103. Sieber, S.A., C.T. Walsh, and M.A. Marahiel, *Loading peptidyl-coenzyme A onto peptidyl carrier proteins: a novel approach in characterizing macrocyclization by thioesterase domains*. J Am Chem Soc, 2003. **125**(36): p. 10862-6.
104. Sunbul, M., K. Zhang, and J. Yin, *Chapter 10 using phosphopantetheinyl transferases for enzyme posttranslational activation, site specific protein labeling and identification of natural product biosynthetic gene clusters from bacterial genomes*. Methods Enzymol, 2009. **458**: p. 255-75.

105. Vitali, F., K. Zerbe, and J.A. Robinson, *Production of vancomycin aglycone conjugated to a peptide carrier domain derived from a biosynthetic non-ribosomal peptide synthetase*. Chem Commun (Camb), 2003(21): p. 2718-9.
106. Yin, J., et al., *Site-specific protein labeling by Sfp phosphopantetheinyl transferase*. Nat Protoc, 2006. **1**(1): p. 280-5.
107. Desai, J.D. and I.M. Banat, *Microbial production of surfactants and their commercial potential*. Microbiol Mol Biol Rev, 1997. **61**(1): p. 47-64.
108. Fiechter, A., *Biosurfactants: moving towards industrial application*. Trends Biotechnol, 1992. **10**(6): p. 208-17.
109. Baltz, R.H., V. Miao, and S.K. Wrigley, *Natural products to drugs: daptomycin and related lipopeptide antibiotics*. Nat Prod Rep, 2005. **22**(6): p. 717-41.
110. Fox, J.E., et al., *Acyl coenzyme A esters differentially activate cardiac and beta-cell adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in a side-chain length-specific manner*. Metabolism, 2003. **52**(10): p. 1313-9.
111. Aron, Z.D., et al., *FenF: servicing the Mycosubtilin synthetase assembly line in trans*. Chembiochem, 2007. **8**(6): p. 613-6.
112. Hansen, D.B., et al., *The loading module of mycosubtilin: an adenylation domain with fatty acid selectivity*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(20): p. 6366-7.
113. Powell, A., et al., *Engineered biosynthesis of nonribosomal lipopeptides with modified fatty acid side chains*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(49): p. 15182-91.
114. Hojati, Z., et al., *Structure, biosynthetic origin, and engineered biosynthesis of calcium-dependent antibiotics from Streptomyces coelicolor*. Chem Biol, 2002. **9**(11): p. 1175-87.
115. Kopp, F., et al., *Harnessing the chemical activation inherent to carrier protein-bound thioesters for the characterization of lipopeptide fatty acid tailoring enzymes*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(8): p. 2656-66.
116. Kirkpatrick, P., et al., *Daptomycin*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(12): p. 943-4.
117. Fukuda, D.S., et al., *A54145, a new lipopeptide antibiotic complex: microbial and chemical modification*. J Antibiot (Tokyo), 1990. **43**(6): p. 601-6.
118. Tally, F.P. and M.F. DeBruin, *Development of daptomycin for gram-positive infections*. J Antimicrob Chemother, 2000. **46**(4): p. 523-6.
119. Baltz, R.H., *Daptomycin: mechanisms of action and resistance, and biosynthetic engineering*. Curr Opin Chem Biol, 2009. **13**(2): p. 144-51.
120. Miao, V., et al., *Daptomycin biosynthesis in Streptomyces roseosporus: cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry*. Microbiology, 2005. **151**(Pt 5): p. 1507-23.
121. Baltz, R.H., et al., *Combinatorial biosynthesis of lipopeptide antibiotics in Streptomyces roseosporus*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2006. **33**(2): p. 66-74.
122. Coeffet-Le Gal, M.F., et al., *Complementation of daptomycin dptA and dptD deletion mutations in trans and production of hybrid lipopeptide antibiotics*. Microbiology, 2006. **152**(Pt 10): p. 2993-3001.
123. Jones, R.N. and A.L. Barry, *Antimicrobial activity and spectrum of LY146032, a lipopeptide antibiotic, including susceptibility testing recommendations*. Antimicrob Agents Chemother, 1987. **31**(4): p. 625-9.
124. Jung, D., et al., *Lipid-specific binding of the calcium-dependent antibiotic daptomycin leads to changes in lipid polymorphism of model membranes*. Chem Phys Lipids, 2008. **154**(2): p. 120-8.
125. Straus, S.K. and R.E. Hancock, *Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1758**(9): p. 1215-23.

126. Requero, M.A., F.M. Goni, and A. Alonso, *The membrane-perturbing properties of palmitoyl-coenzyme A and palmitoylcarnitine. A comparative study.* Biochemistry, 1995. **34**(33): p. 10400-5.
127. Silverman, J.A., N.G. Perlmutter, and H.M. Shapiro, *Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in Staphylococcus aureus.* Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(8): p. 2538-44.
128. Ho, S.W., et al., *Effect of divalent cations on the structure of the antibiotic daptomycin.* Eur Biophys J, 2008. **37**(4): p. 421-33.
129. Scott, W.R., et al., *NMR structural studies of the antibiotic lipopeptide daptomycin in DHPC micelles.* Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(12): p. 3116-26.
130. Wiedemann, B., *Wirksamkeit von Daptomycin bei grampositiven Bakterien.* Chemother J, 2008. **17**: p. 2-9.
131. Miao, V., et al., *The lipopeptide antibiotic A54145 biosynthetic gene cluster from Streptomyces fradiae.* J Ind Microbiol Biotechnol, 2006. **33**(2): p. 129-40.
132. Gokhale, R.S., et al., *Versatile polyketide enzymatic machinery for the biosynthesis of complex mycobacterial lipids.* Nat Prod Rep, 2007. **24**(2): p. 267-77.
133. Arima, K., A. Kakinuma, and G. Tamura, *Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by Bacillus subtilis: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation.* Biochem Biophys Res Commun, 1968. **31**(3): p. 488-94.
134. Kluge, B., et al., *Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from Bacillus subtilis ATCC 21332.* FEBS Lett, 1988. **231**(1): p. 107-10.
135. Bonmatin, J.M., et al., *Solution three-dimensional structure of surfactin: a cyclic lipopeptide studied by 1H-NMR, distance geometry, and molecular dynamics.* Biopolymers, 1994. **34**(7): p. 975-86.
136. Kameda, Y., et al., *Antitumor activity of bacillus natto. V. Isolation and characterization of surfactin in the culture medium of Bacillus natto KMD 2311.* Chem Pharm Bull (Tokyo), 1974. **22**(4): p. 938-44.
137. Tsukagoshi, N., G. Tamura, and K. Arima, *A novel protoplast-bursting factor (surfactin) obtained from Bacillus subtilis IAM 1213. I. The effects of surfactin on bacillus megaterium KM.* Biochim Biophys Acta, 1970. **196**(2): p. 204-10.
138. Singh, P. and S.S. Cameotra, *Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences.* Trends Biotechnol, 2004. **22**(3): p. 142-6.
139. Fuma, S., et al., *Nucleotide sequence of 5' portion of *srfA* that contains the region required for competence establishment in Bacillus subtilis.* Nucleic Acids Res, 1993. **21**(1): p. 93-7.
140. Nakano, M.M., et al., **srfA* is an operon required for surfactin production, competence development, and efficient sporulation in Bacillus subtilis.* J Bacteriol, 1991. **173**(5): p. 1770-8.
141. Steller, S., et al., *Initiation of surfactin biosynthesis and the role of the SrfD-thioesterase protein.* Biochemistry, 2004. **43**(35): p. 11331-43.
142. Menkhaus, M., et al., *Structural and functional organization of the surfactin synthetase multienzyme system.* J Biol Chem, 1993. **268**(11): p. 7678-84.
143. Kunst, F., et al., *The complete genome sequence of the gram-positive bacterium Bacillus subtilis.* Nature, 1997. **390**(6657): p. 249-56.
144. Bujard, H., et al., *A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins in vitro and in vivo.* Methods Enzymol, 1987. **155**: p. 416-33.
145. Sutcliffe, J.G., *Complete nucleotide sequence of the Escherichia coli plasmid pBR322.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1979. **43 Pt 1**: p. 77-90.
146. Mayer, M.P., *A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript.* Gene, 1995. **163**(1): p. 41-6.

147. Miller, J.H., C. Coulondre, and P.J. Farabaugh, *Correlation of nonsense sites in the lacI gene with specific codons in the nucleotide sequence*. Nature, 1978. **274**(5673): p. 770-5.
148. Farabaugh, P.J., et al., *Genetic studies of the lac repressor. VII. On the molecular nature of spontaneous hotspots in the lacI gene of Escherichia coli*. J Mol Biol, 1978. **126**(4): p. 847-57.
149. Messing, J. and J. Vieira, *A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments*. Gene, 1982. **19**(3): p. 269-76.
150. Guerout-Fleury, A.M., et al., *Antibiotic-resistance cassettes for Bacillus subtilis*. Gene, 1995. **167**(1-2): p. 335-6.
151. Bouvier, J., A.P. Pugsley, and P. Stragier, *A gene for a new lipoprotein in the dapA-purC interval of the Escherichia coli chromosome*. J Bacteriol, 1991. **173**(17): p. 5523-31.
152. Horinouchi, S. and B. Weisblum, *Nucleotide sequence and functional map of pE194, a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin type B antibiotics*. J Bacteriol, 1982. **150**(2): p. 804-14.
153. Trieu-Cuot, P. and P. Courvalin, *Nucleotide sequence of the Streptococcus faecalis plasmid gene encoding the 3'5"-aminoglycoside phosphotransferase type III*. Gene, 1983. **23**(3): p. 331-41.
154. Guzman, L.M., et al., *Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter*. J Bacteriol, 1995. **177**(14): p. 4121-30.
155. Southern, E.M., *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. J Mol Biol, 1975. **98**(3): p. 503-17.
156. Sutcliffe, J.G., *pBR322 restriction map derived from the DNA sequence: accurate DNA size markers up to 4361 nucleotide pairs long*. Nucleic Acids Res, 1978. **5**(8): p. 2721-8.
157. Anagnostopoulos, C. and J. Spizizen, *Requirements for Transformation in Bacillus Subtilis*. J Bacteriol, 1961. **81**(5): p. 741-6.
158. Hoch, J.A. and J.L. Mathews, *Chromosomal location of pleiotropic negative sporulation mutations in Bacillus subtilis*. Genetics, 1973. **73**(2): p. 215-28.
159. Nakano, M.M., M.A. Marahiel, and P. Zuber, *Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 1988. **170**(12): p. 5662-8.
160. Cooper, D.G., et al., *Enhanced Production of Surfactin from Bacillus subtilis by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions*. Appl Environ Microbiol, 1981. **42**(3): p. 408-412.
161. Zamenhof, P.J. and M. Villarejo, *Construction and properties of Escherichia coli strains exhibiting -complementation of -galactosidase fragments in vivo*. J Bacteriol, 1972. **110**(1): p. 171-8.
162. Grunewald, S., et al., *In vivo production of artificial nonribosomal peptide products in the heterologous host Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**: p. 3282-3291.
163. Short, J.M., et al., *Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(15): p. 7583-600.
164. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harb Lab. Press, NY, 1989.
165. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
166. Vogelstein, B. and D. Gillespie, *Preparative and analytical purification of DNA from agarose*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(2): p. 615-9.

167. Kuwayama, H., et al., *PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(2): p. E2.
168. LePecq, J.B. and C. Paoletti, *A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. Physical-chemical characterization*. J Mol Biol, 1967. **27**(1): p. 87-106.
169. Mootz, H.D., R. Finking, and M.A. Marahiel, *4'-phosphopantetheine transfer in primary and secondary metabolism of Bacillus subtilis*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37289-98.
170. Borchert, S., T. Stachelhaus, and M.A. Marahiel, *Induction of surfactin production in Bacillus subtilis by gsp, a gene located upstream of the gramicidin S operon in Bacillus brevis*. J Bacteriol, 1994. **176**(8): p. 2458-62.
171. Dubnau, D., *Genetic competence in Bacillus subtilis*. Microbiol Rev, 1991. **55**(3): p. 395-424.
172. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
173. Bennett, J. and K.J. Scott, *Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue*. Anal Biochem, 1971. **43**(1): p. 173-82.
174. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
175. Studier, F.W., *Protein production by auto-induction in high density shaking cultures*. Protein Expr Purif, 2005. **41**(1): p. 207-34.
176. Porath, J., et al., *Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation*. Nature, 1975. **258**(5536): p. 598-9.
177. Gill, S.C. and P.H. von Hippel, *Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data*. Anal Biochem, 1989. **182**(2): p. 319-26.
178. Frangioni, J.V. and B.G. Neel, *Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins*. Anal Biochem, 1993. **210**(1): p. 179-87.
179. Lee, S.G. and F. Lipmann, *Tyrocidine synthetase system*. Methods Enzymol, 1975. **43**: p. 585-602.
180. Mofid, M.R., et al., *Crystallization and preliminary crystallographic studies of Sfp: a phosphopantetheinyl transferase of modular peptide synthetases*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1999. **55**(Pt 5): p. 1098-100.
181. Reuter, K., et al., *Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme sfp: a prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily*. EMBO J, 1999. **18**(23): p. 6823-31.
182. La Clair, J.J., et al., *Manipulation of carrier proteins in antibiotic biosynthesis*. Chem Biol, 2004. **11**(2): p. 195-201.
183. Baltz, R.H., et al., *Applications of transposition mutagenesis in antibiotic producing streptomycetes*. Antonie Van Leeuwenhoek, 1997. **71**(1-2): p. 179-87.
184. Debono, M., et al., *Enzymatic and chemical modifications of lipopeptide antibiotic A21978C: the synthesis and evaluation of daptomycin (LY146032)*. J Antibiot (Tokyo), 1988. **41**(8): p. 1093-105.
185. Saraste, M., P.R. Sibbald, and A. Wittinghofer, *The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins*. Trends Biochem Sci, 1990. **15**(11): p. 430-4.
186. Wessels, P., H. von Dohren, and H. Kleinkauf, *Biosynthesis of acylpeptidolactones of the daptomycin type. A comparative analysis of peptide synthetases forming A21978C and A54145*. Eur J Biochem, 1996. **242**(3): p. 665-73.
187. Kameda, K. and W.D. Nunn, *Purification and characterization of acyl coenzyme A synthetase from Escherichia coli*. J Biol Chem, 1981. **256**(11): p. 5702-7.

188. Black, P.N. and C.C. DiRusso, *Vectorial acylation: linking fatty acid transport and activation to metabolic trafficking*. Novartis Found Symp, 2007. **286**: p. 127-38; discussion 138-41, 162-3, 196-203.
189. Weber, M.H. and M.A. Marahiel, *Coping with the cold: the cold shock response in the Gram-positive soil bacterium Bacillus subtilis*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2002. **357**(1423): p. 895-907.
190. Tang, Y., A.T. Koppisch, and C. Khosla, *The acyltransferase homologue from the initiation module of the R1128 polyketide synthase is an acyl-ACP thioesterase that edits acetyl primer units*. Biochemistry, 2004. **43**(29): p. 9546-55.
191. Sun, X., et al., *A possible glycine radical in anaerobic ribonucleotide reductase from Escherichia coli: nucleotide sequence of the cloned nrdD gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(2): p. 577-81.
192. Huber, F.M., R.L. Pieper, and T. A.J., *The formation of daptomycin by supplying decanoic acid to Streptomyces roseosporus cultures producing the antibiotic complex A21978C* J Biotechnol, 1988. **7**(4): p. 283-292.
193. Byers, D.M. and H. Gong, *Acyl carrier protein: structure-function relationships in a conserved multifunctional protein family*. Biochem Cell Biol, 2007. **85**(6): p. 649-62.
194. Doekel, S., K. Eppelmann, and M.A. Marahiel, *Heterologous expression of nonribosomal peptide synthetases in B. subtilis: construction of a bi-functional B subtilis/E coli shuttle vector system*. FEMS Microbiol Lett, 2002. **216**(2): p. 185-91.
195. Ferrer, M., et al., *Chaperonins govern growth of Escherichia coli at low temperatures*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(11): p. 1266-7.
196. McKay, D.B., et al., *Heterologous expression of biphenyl dioxygenase-encoding genes from a gram-positive broad-spectrum polychlorinated biphenyl degrader and characterization of chlorobiphenyl oxidation by the gene products*. J Bacteriol, 1997. **179**(6): p. 1924-30.
197. Kraas, F., *Untersuchungen zur Aufklärung von Lipoinitiationsmechanismen in der nichtribosomalen Peptidsynthese*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg, 2009.
198. Duitman, E.H., et al., *The mycosubtilin synthetase of Bacillus subtilis ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(23): p. 13294-9.
199. Altschul, S.F., et al., *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(17): p. 3389-402.
200. DiRusso, C.C. and P.N. Black, *Long-chain fatty acid transport in bacteria and yeast. Paradigms for defining the mechanism underlying this protein-mediated process*. Mol Cell Biochem, 1999. **192**(1-2): p. 41-52.
201. Lewin, T.M., et al., *Acyl-CoA synthetase isoforms 1, 4, and 5 are present in different subcellular membranes in rat liver and can be inhibited independently*. J Biol Chem, 2001. **276**(27): p. 24674-9.
202. Caviglia, J.M., et al., *Rat long chain acyl-CoA synthetase 5, but not 1, 2, 3, or 4, complements Escherichia coli fadD*. J Biol Chem, 2004. **279**(12): p. 11163-9.
203. Arora, P., et al., *Promiscuous fatty acyl CoA ligases produce acyl-CoA and acyl-SNAC precursors for polyketide biosynthesis*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(26): p. 9388-9.
204. Trivedi, O.A., et al., *Enzymic activation and transfer of fatty acids as acyl-adenylates in mycobacteria*. Nature, 2004. **428**(6981): p. 441-5.
205. Chiocchini, C., *The surfactin biosynthetic complex of Bacillus subtilis: COM domain-mediated biocombinatorial synthesis, and single step purification of native multi-modular NRPSs and multi-enzyme complexes*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg, 2006.
206. Siedlecki, J., et al., *Array synthesis of novel lipodepsipeptide*. Bioorg Med Chem Lett, 2003. **13**(23): p. 4245-9.

207. Hill, J., et al., *Synthesis and biological activity of N-Acylated ornithine analogues of daptomycin*. Bioorg Med Chem Lett, 2003. **13**(23): p. 4187-91.
208. McHenney, M.A., et al., *Molecular cloning and physical mapping of the daptomycin gene cluster from Streptomyces roseosporus*. J Bacteriol, 1998. **180**(1): p. 143-51.
209. Fritzler, J.M. and G. Zhu, *Functional characterization of the acyl-[acyl carrier protein] ligase in the Cryptosporidium parvum giant polyketide synthase*. Int J Parasitol, 2007. **37**(3-4): p. 307-16.
210. Arora, P., et al., *Mechanistic and functional insights into fatty acid activation in Mycobacterium tuberculosis*. Nat Chem Biol, 2009. **5**(3): p. 166-73.
211. Li, H., et al., *Mechanistic studies of the long chain acyl-CoA synthetase Faa1p from Saccharomyces cerevisiae*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1771**(9): p. 1246-53.
212. Knoll, L.J., D.R. Johnson, and J.I. Gordon, *Biochemical studies of three Saccharomyces cerevisiae acyl-CoA synthetases, Faa1p, Faa2p, and Faa3p*. J Biol Chem, 1994. **269**(23): p. 16348-56.
213. Khare, G., et al., *Dissecting the role of critical residues and substrate preference of a Fatty Acyl-CoA Synthetase (FadD13) of Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8387.
214. Muller, C., et al., *Sequencing and analysis of the biosynthetic gene cluster of the lipopeptide antibiotic Friulimicin in Actinoplanes friuliensis*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(3): p. 1028-37.
215. Tang, G.L., Y.Q. Cheng, and B. Shen, *Chain initiation in the leinamycin-producing hybrid nonribosomal peptide/polyketide synthetase from Streptomyces atroolivaceus S-140. Discrete, monofunctional adenylation enzyme and peptidyl carrier protein that directly load D-alanine*. J Biol Chem, 2007. **282**(28): p. 20273-82.
216. Hisanaga, Y., et al., *Structural basis of the substrate-specific two-step catalysis of long chain fatty acyl-CoA synthetase dimer*. J Biol Chem, 2004. **279**(30): p. 31717-26.
217. Cole, P.A., *Chaperone-assisted protein expression*. Structure, 1996. **4**(3): p. 239-42.
218. Georgiou, G. and P. Valax, *Expression of correctly folded proteins in Escherichia coli*. Curr Opin Biotechnol, 1996. **7**(2): p. 190-7.
219. Schauwecker, F., et al., *Molecular cloning of the actinomycin synthetase gene cluster from Streptomyces chrysomallus and functional heterologous expression of the gene encoding actinomycin synthetase II*. J Bacteriol, 1998. **180**(9): p. 2468-74.
220. Smith, D.J., A.J. Earl, and G. Turner, *The multifunctional peptide synthetase performing the first step of penicillin biosynthesis in Penicillium chrysogenum is a 421,073 dalton protein similar to Bacillus brevis peptide antibiotic synthetases*. EMBO J, 1990. **9**(9): p. 2743-50.
221. Konz, D. and M.A. Marahiel, *How do peptide synthetases generate structural diversity?* Chem Biol, 1999. **6**(2): p. R39-48.
222. Lautru, S. and G.L. Challis, *Substrate recognition by nonribosomal peptide synthetase multi-enzymes*. Microbiology, 2004. **150**(Pt 6): p. 1629-36.
223. Penn, J., et al., *Heterologous production of daptomycin in Streptomyces lividans*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2006. **33**(2): p. 121-8.
224. Ikeda, H. and S. Omura, *Avermectin Biosynthesis*. Chem Rev, 1997. **97**(7): p. 2591-2610.
225. August, P.R., et al., *Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: deductions from the molecular analysis of the rif biosynthetic gene cluster of Amycolatopsis mediterranei S699*. Chem Biol, 1998. **5**(2): p. 69-79.
226. Wilkinson, C.J., et al., *Chain initiation on the soraphen-producing modular polyketide synthase from Sorangium cellulosum*. Chem Biol, 2001. **8**(12): p. 1197-208.

- 227. He, J. and C. Hertweck, *Iteration as programmed event during polyketide assembly; molecular analysis of the aureothin biosynthesis gene cluster*. Chem Biol, 2003. **10**(12): p. 1225-32.
- 228. Gokhale, R.S., R. Sankaranarayanan, and D. Mohanty, *Versatility of polyketide synthases in generating metabolic diversity*. Curr Opin Struct Biol, 2007. **17**(6): p. 736-43.
- 229. Matsuoka, H., K. Hirooka, and Y. Fujita, *Organization and function of the YsiA regulon of Bacillus subtilis involved in fatty acid degradation*. J Biol Chem, 2007. **282**(8): p. 5180-94.
- 230. Matsunaga, I., et al., *Characterization of the ybdT gene product of Bacillus subtilis: novel fatty acid beta-hydroxylating cytochrome P450*. Lipids, 1999. **34**(8): p. 841-6.
- 231. Tosato, V., et al., *Sequence completion, identification and definition of the fengycin operon in Bacillus subtilis 168*. Microbiology, 1997. **143** (Pt 11): p. 3443-50.
- 232. Sakuno, E., et al., *Purification and gene cloning of a dehydrogenase from Lactobacillus brevis that catalyzes a reaction involved in aflatoxin biosynthesis*. Biosci Biotechnol Biochem, 2008. **72**(3): p. 724-34.
- 233. Hitchman, T.S., et al., *Hexanoate synthase, a specialized type I fatty acid synthase in aflatoxin B1 biosynthesis*. Bioorg Chem, 2001. **29**(5): p. 293-307.
- 234. Black, P.N. and C.C. DiRusso, *Transmembrane movement of exogenous long-chain fatty acids: proteins, enzymes, and vectorial esterification*. Microbiol Mol Biol Rev, 2003. **67**(3): p. 454-72, table of contents.
- 235. Rodionov, D.A., A.A. Mironov, and M.S. Gelfand, *Conservation of the biotin regulon and the BirA regulatory signal in Eubacteria and Archaea*. Genome Res, 2002. **12**(10): p. 1507-16.
- 236. Bar-Tana, J., et al., *Palmitoyl-coenzyme A synthetase. Mechanism of reaction*. Biochem J, 1973. **131**(2): p. 199-209.
- 237. Philipp, D.P. and P. Parsons, *Isolation and purification of long chain fatty acyl coenzyme A ligase from rat liver mitochondria*. J Biol Chem, 1979. **254**(21): p. 10776-84.
- 238. Shockey, J.M., M.S. Fulda, and J. Browse, *Arabidopsis contains a large superfamily of acyl-activating enzymes. Phylogenetic and biochemical analysis reveals a new class of acyl-coenzyme a synthetases*. Plant Physiol, 2003. **132**(2): p. 1065-76.
- 239. Graumann, P., et al., *A family of cold shock proteins in Bacillus subtilis is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures*. Mol Microbiol, 1997. **25**(4): p. 741-56.
- 240. Beckering, C.L., et al., *Genomewide transcriptional analysis of the cold shock response in Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 2002. **184**(22): p. 6395-402.
- 241. Schoenafinger, G., et al., *Formylation domain: an essential modifying enzyme for the nonribosomal biosynthesis of linear gramicidin*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(23): p. 7406-7.
- 242. Kessler, N., et al., *The linear pentadecapeptide gramicidin is assembled by four multimodular nonribosomal peptide synthetases that comprise 16 modules with 56 catalytic domains*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 7413-9.
- 243. Miller, D.A., et al., *Yersiniabactin synthetase: a four-protein assembly line producing the nonribosomal peptide/polyketide hybrid siderophore of Yersinia pestis*. Chem Biol, 2002. **9**(3): p. 333-44.
- 244. Lombo, F., et al., *Deciphering the biosynthesis pathway of the antitumor thiocoraline from a marine actinomycete and its expression in two streptomyces species*. Chembiochem, 2006. **7**(2): p. 366-76.

Vielen Dank !

„Eine wissenschaftliche Entdeckung ist nie die Entdeckung von nur einer Person“
(Louis Pasteur)

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mir während meiner Promotionsphase mit Rat und Tat zur Seite standen und damit zum Gelingen dieser Dissertation beitrugen.

Allen voran möchte ich Herrn Professor Dr. M. A. Marahiel danken, nicht nur für sein stetes Interesse und die Betreuung dieser wissenschaftlichen Arbeit, sondern auch für die großzügig ausgestattete Arbeitsumgebung.

Hr. Prof. Dr. L.-O. Essen danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Uwe Linne für seine enorme Unterstützung im Verlauf dieser Arbeit, für die abschließende Durchsicht der Dissertation, seine stete konstruktive Diskussionsbereitschaft und seine Hilfe bei diversen MS-Messungen, die für diese Arbeit essenziell waren.

Bei den freundlichen Korrekturlesern meiner Arbeit Lars Robbel, Thomas Knappe und Alan Tanovic, die auch während des „Laboralltags“ für anregende und abwechslungsreiche Diskussionen sorgten, bedanke ich mich recht herzlich.

Femke Kraas möchte ich dafür danken, dass sie an meinem Projekt mit hohem Engagement weiterarbeitet. Ich wünsche ihr hierfür weiterhin viel Erfolg!

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Rosi Roller-Müller, für ihr organisatorisches Talent und ihre enorme Unterstützung in allen Lebenslagen.

Mein Dank gilt auch Antje Schäfer für ihr enormes Engagement für die Arbeitsgruppe, vor allem für ihr schnelles Handeln bei größeren und kleineren Problemen. Christiane Bomm danke ich für die „tierische“ Abwechslung und Gabi Schimpff-Weiland danke ich für die tiefgründigen Gespräche.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises Marahiel bin ich dankbar dafür, dass ich mich dort immer wohlfühlt habe, insbesondere dem Labor 4716 für das gute Arbeitsklima.

Nicht zu vergessen ist mein Freund Björn Karger, der mich schon während des gesamten Studiums durch alle Höhen und Tiefen begleitet hat. Ihm bin ich besonders dankbar für seine enorme Unterstützung, für sein bedingungsloses Verständnis, auch in schwierigen Zeiten, in denen er es immer wieder schaffte mich auf andere Gedanken zu bringen - auch wenn er mich gern öfters gesehen hätte.

Weiter danke ich meiner Schwester für die moralische Unterstützung, die immer ein Ohr für mich hatte, egal zu welcher Tages- und Nachtzeit und die nie aufhörte an mich zu glauben.

Mein allergrößter Dank gebührt jedoch meinem Vater, der mir den nötigen Rückhalt für meine Arbeit gab. Ohne ihn wären mein Studium und meine Promotion nicht möglich gewesen. Daher widme ich ihm diese wissenschaftliche Abhandlung.